

Untersuchungen zur Funktion der Proteine SHMT6 und SHMT7 in *Arabidopsis thaliana*



Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Steffen Müller, geb. am 10.3.1976 in Schwedt/Oder

am 6.5.2010 in Rostock

verteidigt am 1.11.2010

Gutachter

Prof. Dr. Hermann Bauwe

(Universität Rostock)

PD Dr. Alisdair Fernie

(MPI Golm)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1.	SERIN-HYDROXYMETHYLTRANSFERASEN	1
1.1.1.	PHOTORESPIRATION	2
1.1.2.	SHMT UND PHOTORESPIRATION	4
1.1.3.	DER ROLLE DER SHMT IM PFLANZLICHEN C1-METABOLISMUS	4
1.1.4.	SHMT IM KONTEXT DES C1-METABOLISMUS	6
1.1.5.	C1-ABHÄNGIGE METHYLIERUNGSREAKTIONEN IN PFLANZEN	8
1.1.6.	DNA-METHYLIERUNG UND DIE EFFEKTE AUF DIE GENEXPRESSION	10
1.1.7.	SHMT-GENFAMILIE IN ARABIDOPSIS THALIANA	11
1.2.	ZIELE DER ARBEIT	16
2.	<u>MATERIALIEN UND METHODEN</u>	17
2.1.	MATERIALIEN	17
2.1.1.	CHEMIKALIEN	17
2.1.2.	ENZYME	17
2.1.3.	VERWENDETE KITS UND FERTIGLÖSUNGEN	17
2.1.4.	SOFTWARE UND WEBSITES	18
2.1.5.	ANTIBIOTIKA	18
2.1.6.	SEQUENZIERUNGEN	18
2.1.7.	VEKTOREN UND OLIGONUKLEOTIDE	19
2.1.8.	MARKER UND STANDARDS	19
2.1.9.	ORGANISMEN	19
2.1.10.	MEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE FÜR DIE ANZUCHT DER ORGANISMEN	19
2.2.	ARBEITEN MIT BAKTERIEN	20
2.2.1.	KULTURBEDINGUNGEN UND LAGERUNG BAKTERIEN	20
2.2.2.	MESSUNG DER OPTISCHEN DICHTEN VON BAKTERIENSUSPENSIONEN	21
2.2.3.	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN UND TRANSFORMATION	21
2.2.4.	PLASMIDPRÄPARATION AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	21
2.2.5.	COLONY PCR	22
2.3.	ARBEITEN MIT PFLANZEN	22
2.3.1.	STERILISIEREN VON PFLANZENSAMEN	22
2.3.2.	WACHSTUM VON <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	22
2.3.3.	ISOLIERUNG VON DNA UND RNA AUS ARABIDOPSIS	22
2.3.4.	TRANSFORMATION VON ARABIDOPSIS MITTELS AGROBAKTERIEN	23
2.3.5.	SCREENING VON POPULATIONEN TRANSGENER PFLANZEN	23

2.3.6. KEIMUNGSTEST	23
2.3.7. WURZELWACHSTUMS-ASSAY	24
2.3.8. PFLANZENANZUCHT ZUR CHARAKTERISIERUNG DER <i>SHM6/7</i> T-DNA <i>KNOCK-OUT</i> -LINIEN	24
2.3.9. AUFARBEITUNG VON PFLANZENMATERIAL FÜR AMINOSÄUREANALYSE MITTELS HPLC	25
2.3.10. EXTRAKTION VON KOMPONENTEN DES PRIMÄRSTOFFWECHSELS ZUR GC-MS-ANALYSE	25
2.3.11. ISOLIERUNG VON PROTOPLASTEN ZUR MIKROSKOPIE	26
2.3.12. HISTOCHEMISCHER GUS-ASSAY	26
2.4. ARBEITEN MIT DNA	26
2.4.1. PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	26
2.4.2. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	26
2.4.3. POLYMERASE-KETTENREAKTION	27
2.4.4. REVERSE TRANSKRIPTION, cDNA-SYNTHESE	27
2.4.5. REINIGUNG VON DNA MIT DEM NUCLEOSPIN® EXTRACT II KIT	27
2.4.6. RESTRIKTION VON DNA	27
2.4.7. LIGATION VON DNA-SEQUENZEN	28
2.4.8. KLONIEREN EINER DNA- SEQUENZ	28
2.4.9. SOUTHERN-BLOT	28
2.5. ARBEITEN MIT PROTEINEN	29
2.5.1. PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG	29
2.5.2. SDS-POLYACRYLAMIDGELEKTROPHORESE	29
2.6. HETEROLOGE EXPRESSION UND REINIGUNG VON PROTEINEN	30
2.6.1. ÜBEREXPRESSION VON SHMT IN <i>E. COLI</i>	30
2.6.2. REINIGUNG DER PROTEINE NACH EXPRESSION IN <i>E. COLI</i>	30
2.7. SHMT ASSAY	31
2.8. MIKROSKOPISCHE TECHNIKEN	32
2.8.1. VERWENDETE MIKROSKOPE	32
<u>3. ERGEBNISSE</u>	<u>34</u>
3.1. VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR VON SHMT6 UND SHMT7	34
3.1.1. SHMT-DOMÄNE UND DEREN STRUKTURMERKMALE	34
3.1.2. STRUKTURBESONDERHEITEN VON SHMT6 UND SHMT7	38
3.2. NACHWEIS DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON SHMT6 UND SHMT7	40
3.2.1. MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN TRANSGENER PFLANZEN	41
3.3. ENTWICKLUNGSABHÄNGIGE UND GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VON SHM6 UND SHM7	44
3.4. VERSUCHE ZUR BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT VON SHMT6 UND SHMT7 IN-VITRO	47
3.4.1. EXPRESSION UND REINIGUNG REKOMBINANTER SHMT	47

3.5.	ISOLIERUNG HOMOZYGOTER ARABIDOPSIS-PFLANZEN MIT DEFECT IN <i>AtSHM6</i> UND <i>AtSHM7</i>	52
3.6.	CHARAKTERISIERUNG DER SHM6/7 T-DNA-INSERTIONSLINIEN	54
3.6.1.	WACHSTUM IM KEIMLINGSSTADIUM	55
3.6.2.	EINFLUSS VON GIBBERELLINSÄURE AUF DIE KEIMUNG	60
3.6.3.	WACHSTUM BIS ZUR REIFEN PFLANZE	61
3.6.4.	ANALYSE VON PRIMÄRMETABOLITEN IN DEN MUTANTEN UND WILDTYPE	64
3.6.5.	EINFLUSS VON SHMT6 UND SHMT7 AUF DIE PHOTOSYNTHETISCHE LEISTUNG	69
3.6.6.	UNTERSUCHUNG DES METHYLIERUNGSSTATUS' IN DEN <i>KNOCK-OUT</i> -MUTANTEN	70
4.	<u>DISKUSSION</u>	74
4.1.	VORKOMMEN VON SHMT6 UND SHMT7	74
4.1.1.	SHMT6 UND SHMT7 SIND IM ZELLKERN LOKALISIERT	74
4.1.2.	DIE PROMOTOREN VON SHM6 UND SHM7 SIND IN ALLEN GEWEBEN AKTIV	75
4.2.	REKOMBINANTE SHMT6 UND SHMT7 ZEIGEN KEINE SHMT-AKTIVITÄT IM RADIOASSAY	75
4.3.	CHARAKTERISIERUNG DER T-DNA-MUTANTEN	77
4.3.1.	KNOCK-OUT IN <i>SHM6</i> UND <i>SHM7</i> BEEINFLUSST DAS FRÜHE WACHSTUM	77
4.3.2.	SHMT6 UND SHMT7 SIND AN VIELEN STOFFWECHSELPROZESSEN BETEILIGT	80
4.3.3.	DIE DOPPELMUTANTE <i>SHM6+7</i> IST HYPOMETHYLIERT	84
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	87
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	89
7.	<u>ANHANG</u>	95
7.1.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	95
7.2.	VEKTOREN UND OLIGONUKLEOTIDE	96
7.3.	SEQUENZEN	98

1. Einleitung

1.1. Serin-Hydroxymethyltransferasen

Serin-Hydroxymethyltransferasen (SHMT; EC 2.1.2.1) stellen eine im gesamten Organismenreich vorkommende Gruppe von Enzymen dar, deren bevorzugte Reaktion die Konversion von Serin nach Glycin ist (Abb. 1). Diese reversible Reaktion findet in Prokaryoten und Eukaryoten statt und dient vorrangig der Bereitstellung von Ein-Kohlenstoff-Einheiten (C1-Einheiten) durch Bildung von 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat (Met-THF, Abb. 2) nach Spaltung eines Moleküls Serin (Martini et al. 1987, Schirch and Peterson 1980, Schirch et al. 1985). In eukaryotischen Spezies sind SHMTs in mehreren Kompartimenten zu finden. Verschiedene Isoformen werden den Mitochondrien, dem Cytosol, Plastiden und vermutlich dem Zellkern zugeordnet (Besson et al. 1995, Neuburger et al. 1986, Turner et al. 1992).

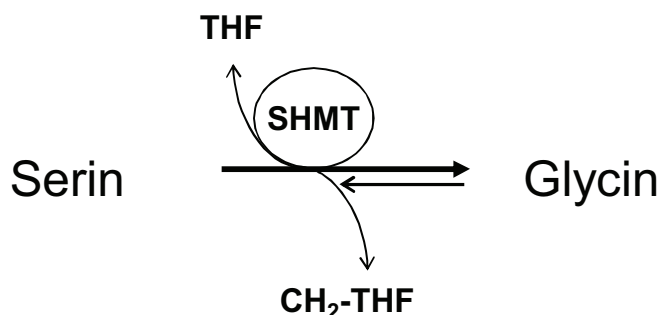


Abb. 1. Serin-Glycin-Interkonversion. Die Spaltung von Serin ist thermodynamisch bevorzugt und liefert Methylentetrahydrofolat.

Insbesondere in den Mitochondrien von Pflanzen verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht der Serin-Glycin-Interkonversion in Richtung der Bildung von Serin, da hier hohe Mengen an Glycin vorliegen. Der kooperierende mitochondriale Glycin-Decarboxylasekomplex (GDC) liefert durch Oxidierung von Glycin ständig CH₂-substituiertes Tetrahydrofolat und stellt so die für die Bildung von Serin benötigte aktivierte C1-Gruppe bereit (Abb. 3). Damit fungieren sowohl SHMT als auch GDC als Lieferanten von C1-Einheiten aus dem Serin-Glycin-Metabolismus (Bourguignon et al. 1995, Mouillon et al. 1999).

Mit einer bekannten Ausnahme (Sukanya et al. 1991) sind SHMT Pyridoxal-5-phosphat (PLP)-abhängige Enzyme. Eine hochkonservierte PLP-Bindedomäne in der Aminosäuresequenz, mit einem Lysinrest als Bindungsort für PLP, kommt ubiquitär im Organismenreich vor. Die Tertiärstrukturen der SHMT sind Dimere und Tetramere aus identischen Untereinheiten von ~45-53 kDa. Erstere finden sich insbesondere unter den prokaryotischen Vertretern, während letztere Form charakteristisch für höhere Eukaryoten (Rao et al. 2000) ist.

Die PLP-Bindedomäne ist ein charakteristisches Strukturmerkmal der SHMT. Trotz zum Teil geringer Sequenzidentitäten zwischen SHMT verschiedener Spezies (z.B. ~45 % zwischen *E. coli* und humaner cytosolischer SHMT) bilden sie doch die gleichen Monomerstrukturen und sind enzymatisch aktiv. Die höchsten Übereinstimmungen mit Identitäten von ~86-98 % in der Aminosäuresequenz, finden sich unter tierischen Spezies zwischen cytosolischen Isoformen.

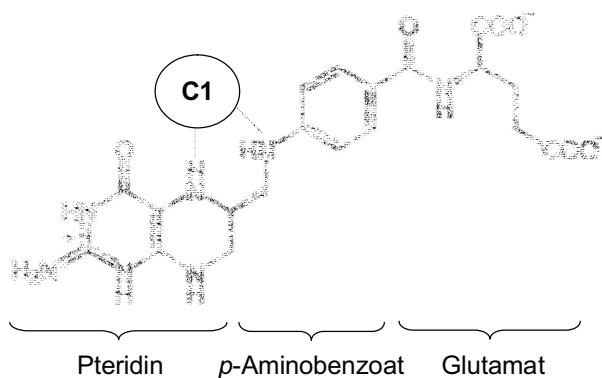


Abb. 2. Struktur von Tetrahydrofolat. Durch Bindung an THF werden C1-Verbindungen aktiviert und stehen so für metabolische Prozesse zur Verfügung.

1.1.1. Photorespiration

Die Bifunktionalität der RUBISCO (Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase) initiiert den Prozess der Photorespiration durch Bindung von Sauerstoff (O_2) an Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP). Als Produkte entstehen 2-Phosphoglycolat (2-PG) und 3-Phosphoglycerat (3-PGA). Da das 2-PG ein toxisches Intermediat ist, wird es durch eine Reaktionsfolge, die sich über Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien erstreckt, zu 3-PGA umgesetzt (Abb. 3), welches dem Calvin-Zyklus zugeführt wird.

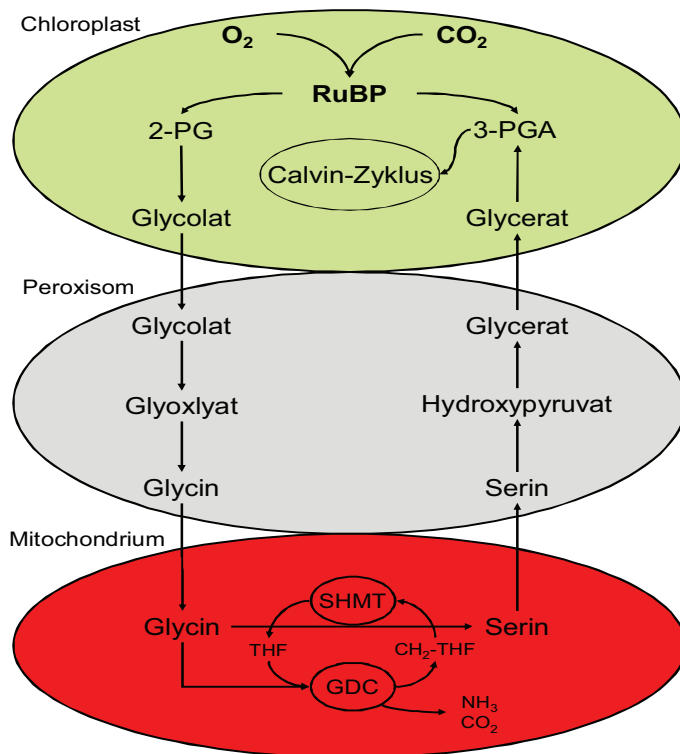


Abb. 3. Schematische Darstellung des photorespiratorischen C2-Zyklus. Ausgangspunkt ist die Oxygenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat durch die RUBISCO. Ein potentiell toxisches Reaktionsprodukt, 2-Phosphoglycolat (2-PG), wird in einer enzymatischen Reaktionsfolge, die sich über 3 Kompartimente verteilt, in 3-Phosphoglycerat (3-PGA) umgesetzt. 3-PGA liefert einen Teil des Kohlenstoffgerüsts für die Synthese von Monosacchariden oder wird zur Regenerierung des O_2/CO_2 -Akzeptors RuBP verwendet. SHMT katalysiert hier die Übertragung der Hydroxy- und Methylengruppe auf Glycin. Serin wird durch die Aktivität einer mitochondrialen SHMT aus 2 Molekülen Glycin unter Beteiligung des GDC gebildet. (Grafik nach Buchanan, Gruissem, Jones: BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS)

Der photorespiratorische oder C2-Zyklus regeneriert also unter Verbrauch von ATP und Reduktionsäquivalenten zwei toxische C2-Körper in einen C3-Körper, der unter anderem für den Aufbau von Zuckermolekülen benötigt wird. Dieser unter Energieverbrauch betriebene Stoffwechselweg steht prinzipiell in Konkurrenz zur photosynthetischen CO_2 -Assimilierung. Die Rubisco kann sowohl Sauerstoff als auch Kohlendioxid zur Fixierung in RuBP verwenden. Dabei spielen das interzelluläre CO_2/O_2 -Verhältnis und die Temperatur eine entscheidende Rolle für die Fixierungsleistung. Dies hat Konsequenzen für die photosynthetische Leistung der Pflanzen und damit Einfluss auf das Wachstum. Eine erhöhte Affinität der Rubisco zu O_2 durch hohe Temperaturen und ein verringertes Verhältnis von CO_2 zu O_2 führen unweigerlich zu einer Beeinträchtigung der photosynthetischen Leistung (Laing et al.

1974). Für viele Pflanzen der gemäßigten Klimazone, die vom C3-Typ sind, haben die Photorespiration und ihre Folgen einen großen Einfluss auf die Entwicklung.

1.1.2. SHMT und Photorespiration

Die Serin-Glycin Umwandlung beim photorespiratorischen C2-Zyklus findet in den Mitochondrien statt. Dort ist die enzymatische Aktivität des GDC höher als die der SHMT. Durch das veränderte Gleichgewicht zwischen THF und CH₂-THF (hohe CH₂-THF/THF-Ratio) wird Glycin zum favorisierten Substrat der SHMT und die Bildung von Serin thermodynamisch möglich. Diese Verlagerung im Reaktionsgleichgewicht ist eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des pflanzlichen C2-Zyklus als essentieller Bestandteil der Photorespiration (Douce et al. 2001, Voll et al. 2006).

Ein reduzierter Gehalt der mitochondrialen SHMT bzw. ein weitgehender Verlust der SHMT-Aktivität in Mitochondrien führt in Kartoffeln (Schjoerring et al. 2006) und *Arabidopsis* (Voll et al. 2006) zu einem photorespiratorischen Phänotyp, der unter Normalluftbedingungen durch reduziertes oder inhibiertes Wachstum (atmosphärische Bedingungen) mit Ausbildung chlorotischer Blätter gekennzeichnet ist (Somerville and Ogren 1982, Voll et al. 2006). Als Ursache wird eine Akkumulierung toxischer Stoffwechselintermediate postuliert (Ogren 1984). Die Photorespiration und der chlorotische Phänotyp lässt sich experimentell durch Begasung mit Luft erhöhter CO₂-Konzentration unterdrücken, was an diversen photorespiratorischen *Arabidopsis*-Mutanten bestätigt wurde (Boldt et al. 2005, Schwarte and Bauwe 2007, Timm et al. 2008, Voll et al. 2006).

1.1.3. Der Rolle der SHMT im pflanzlichen C1-Metabolismus

Übersicht über den C1-Metabolismus

Unter dem C1-Metabolismus versteht man ein Netzwerk aus Reaktionswegen, das zur Bildung und Umwandlung von Ein-Kohlenstoffeinheiten (C1-Einheiten) führt und diese an Akzeptormoleküle weitergibt. Mit C1-Einheiten werden in diesem Zusammenhang Moleküle wie Methyl-(CH₃-), Methylen-(CH₂-), Methenyl- (CH-) oder Formyl (CHO-)-Reste bezeichnet. Sie sind essentielle Bausteine für Intermediate des Primär- und Sekundärstoffwechsels in allen Organismen (Appling 1991, Cossins and Chen 1997, Hanson and Roje 2001). Als Träger dieser Ein-Kohlenstoffverbindungen

dient die aktive Form der Folate, das Tetrahydrofolat (THF). Diese C1-substituierten THF-Derivate lassen sich leicht enzymatisch ineinander umwandeln und bilden den Kern des C1-Metabolismus (Hanson and Roje 2001) (Abb. 4).

Es soll hier darauf hingewiesen werden, dass der Begriff Folat der Vereinfachung wegen für alle Folatspezies verwendet wird, die auf das THF zurück zu führen sind. Tetrahydrofolat wird in Pflanzen *de-novo* synthetisiert. An den Reaktionen sind mehrere Enzyme beteiligt, die sich über mindestens drei Kompartimente verteilen (Reibellé, F. et al. 2006). Die letzten Reaktionsschritte einschließlich der Synthese von Tetrahydrofolat finden im Mitochondrium statt. Daher ist anzunehmen, dass es Transportwege über Plasmamembranen hinweg in andere Zellorganellen geben muss.

Durch enzymatische Umwandlung von Serin, Glycin oder Format, als wichtigste Quellen, werden C1-Gruppen auf THF übertragen und so ein *pool* substituierter, aktiver Folate geschaffen (Vgl. Abb. 4), die ineinander umwandelbar sind. Tetrahydrofolat liegt in Pflanzen hauptsächlich als polyglutamylierte Verbindung vor (Appling 1991). Durch die Aktivität der Folylpolyglutamat-Synthase wird das natürlich vorkommende monoglutamylierte THF größtenteils in die Hexa- und Pentaglutamatform umgewandelt. Diese beiden Formen bilden zum Beispiel den Hauptanteil an Folaten in Chloroplasten und Mitochondrien aus Blättern und Kotyledonen von *Pisum sativum* (Besson et al. 1993b, Imeson et al. 1990) und sind die bevorzugten Substrate der SHMT. Diese *pools* substituierter Folate sind in den biosynthetisch aktiven Kompartimenten einer Pflanzenzelle weitgehend autonom (Appling 1991, Basset et al. 2005). Die Beladung mit C1-Einheiten findet daher in den jeweiligen Organellen statt, so dass demzufolge die dafür notwendigen Enzyme, darunter SHMT, hier aktiv sein müssen.

In Pflanzen werden C1-substituierte THF-Derivate direkt für die Synthese einer Reihe von Verbindungen verwendet. Zu erwähnen sind die Biosynthese der Purine und Pyrimidine, die Bildung von Pantothenat, einem Baustein des Coenzym A, sowie der Aminosäuren Methionin, Glycin und Serin als Strukturbausteine der Proteine. Dem Methionin kommt eine weitere wichtige Funktion zu. Als Vorstufe von S-Adenosylmethionin (AdoMet) liefert es die Methylgruppen für viele weitere

Methylierungen, z.B. von DNA und RNA, sowie Proteinen und Lipiden (Rebeille 2006). Der weitaus größte Bedarf an Methylgruppen besteht jedoch für die Synthese von Sekundärmetaboliten wie Alkaloide, Betaine oder Lignine (Hanson and Roje 2001) und deren Vorstufen. Daneben ist AdoMet Vorstufe für die Biosynthese von Polyaminen (Spermin, Spermidin u.a.), sowie Ethylen und Nicotinamin. Durch den hohen Bedarf an Methionin ist das Methyl-THF die dominierende Folatspezies in der Zelle.

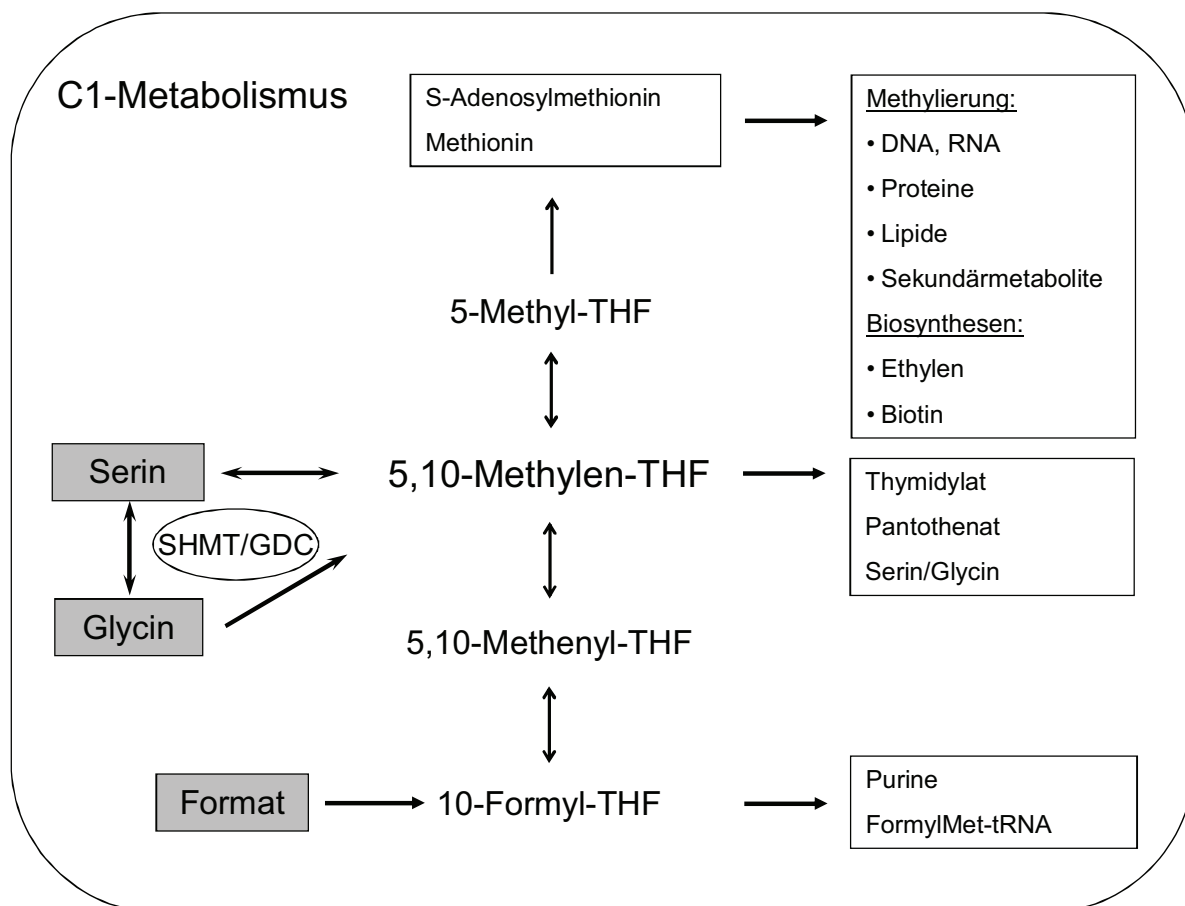


Abb. 4. Folatabhängiger C1-Metabolismus. Hauptquellen sind Serin, Glycin und Format (graue Boxen). Die THF-Derivate sind ineinander umwandelbar und liefern C1-Körper für die Bildung wichtiger Metabolite bzw. sind Vorstufen derselben, sowie für die Methylierung einer Vielzahl von Verbindungen (weiße Boxen). Schematisch nach (Hanson and Roje 2001).

1.1.4. SHMT im Kontext des C1-Metabolismus

Die Spaltung von Serin durch die SHMT stellt die wichtigste Quelle von C1-Einheiten in allen Geweben, außerhalb der Mitochondrien dar (Mouillon et al. 1999, Oliver 1994). Das macht dieses Protein zu einem zentralen Enzym des C1-Metabolismus.

Neben Serin spielen Glycin und Format eine Rolle bei der Einspeisung von C1-Einheiten in den C1-Kreislauf. Die in einem Gleichgewicht stehenden C1-THF-Derivate sind in den pflanzlichen Kompartimenten weitgehend isoliert und werden nicht über Membranen ausgetauscht.

In den Mitochondrien wird $\text{CH}_2\text{-THF}$ aus dem Glycin-Katabolismus gewonnen. Dafür verantwortlich ist der GDC. Durch die Reaktionen dieses Enzymkomplexes, bestehend aus P-, T-, H-, und L-Proteinuntereinheiten (Oliver 1994), wird ein Molekül Glycin in CO_2 und NH_3 gespalten und Methylen-THF gebildet. Nachfolgend wird Serin aus einem weiteren Molekül Glycin und $\text{CH}_2\text{-THF}$ durch die SHMT synthetisiert. In den anderen Kompartimenten mit Bedarf an C1-Einheiten läuft die SHMT-Reaktion in der favorisierten Richtung der Bildung von Glycin ab.

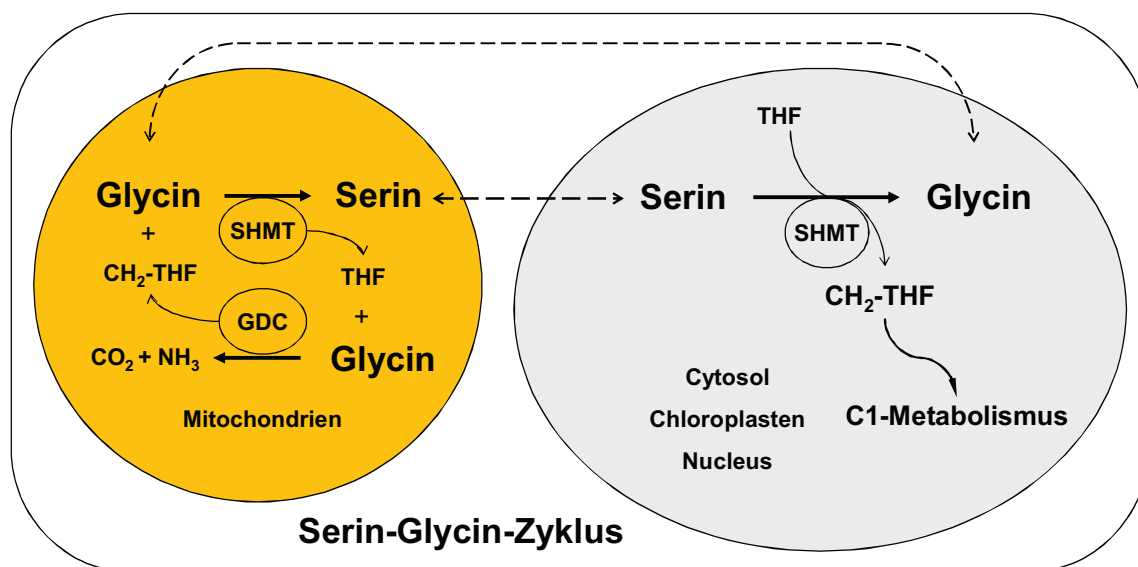


Abb. 5. Schema des Serin-Glycin-Zyklus. In den Mitochondrien werden 2 Moleküle Glycin für die Bildung von 1 Molekül Serin verwendet. Der Austausch von Serin und Glycin erfolgt durch aktive Transportprozesse. Cytosolische, chloroplastidäre und nukleäre Serin-Hydroxymethyltransferasen nutzen Serin als Hauptquelle für C1-Verbindungen.

Serin und Glycin werden wie andere Aminosäuren über Plasmamembranen transportiert (Bush 1993) und können somit zwischen den Organellen ausgetauscht werden. Ein solcher Serin-Glycin-Zyklus (Abb. 5) zwischen Mitochondrien und anderen Kompartimenten erfüllt eine wichtige Funktion bei der fortlaufenden Bereitstellung von C1-Verbindungen. Da für jede C1-Einheit ein Molekül Glycin gebildet wird, ist ein rasches Recycling unabdingbar, um die SHMT-Reaktion am

Laufen zu halten. Andernfalls würde es zu einem starken Abfall verfügbarer C1-Verbindungen kommen. Indem Glycin in die Mitochondrien gelangt, kann im Austausch Serin in das Cytosol und in andere Organellen transportiert werden, wo durch Biosynthesen und Methylierungsreaktionen ein hoher Bedarf an C1-Verbindungen besteht. Durch die weitgehend isolierten C1-THF-*pools* in den Zellorganellen ist die Anwesenheit mindestens einer SHMT in allen Zellkompartimenten erforderlich, die C1-Verbindungen benötigen.

1.1.5. C1-abhängige Methylierungsreaktionen in Pflanzen

Wie bereits erwähnt, sind Methylierungen bei einer großen Anzahl von Verbindungen des Primär- und Sekundärstoffwechsels und auch DNA oder RNA beteiligt. Ausgehend von Folatderivaten dient AdoMet dabei als der universelle Methylgruppendonor und wird von der Gruppe der O-, N- und G- Methyltransferasen verwendet (Roje 2006). Sie alle nutzen somit eine Methylgruppe aus dem C1-Metabolismus. S-Adenosylmethionin ist der wichtigste Methylgruppendonor für Methylierungsreaktionen und ein Intermediat für die Biosynthese von Ethylen und Polyaminen (Roje 2006). Es wird aus der Aminosäure Methionin durch Adenylierung mit ATP gebildet. Nachdem der Akzeptor die Methylgruppe übernommen hat, entsteht Adenosylhomocystein (AdoHcy), welches ein starker Inhibitor der Methyltransferasen ist (Hanson and Roje 2001). Die Reaktionsschritte sind in dem S-Adenosylmethionin-Zyklus (AdoMet-Zyklus, Abb. 6) zusammengefasst, in dem Homocystein der erste Akzeptor einer Methylgruppe aus dem C1-Metabolismus ist. Die Methionin-Synthase überträgt die Methylgruppe von Methyl-THF auf Homocystein. Weitere Enzyme dieses Kreislaufs sind die AdoMet-Synthetase, eine Methyltransferase, sowie Adenosyl-Homocystein-Hydrolase.

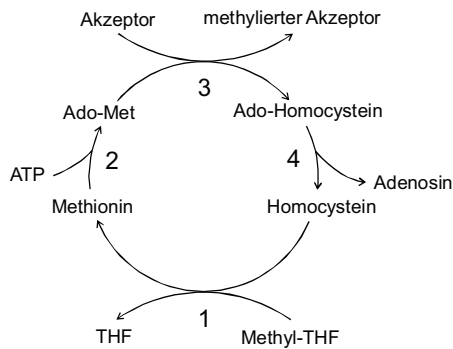


Abb. 6. S-Adenosylmethionin-Zyklus. Methionin wird aus Homocystein und Methyl-THF gebildet. Nachdem Ado-Met die Methylgruppe auf einen Akzeptor übertragen hat, muss Ado-Homocystein als toxisches Zwischenprodukt rasch im Cytosol abgebaut werden. 1, Methionin-Synthase. 2, AdoMet-Synthetase. 3, AdoMet abhängige Methyltransferase. 4, Ado-Hcy-Hydrolase

Transmethylierungsreaktionen sind in den Biosynthesewegen von Sekundärmetaboliten obligat. Die Intermediate verschiedener Stoffwechselwege sind ein oder mehrfach methyliert. So erfordert die Bildung des Phenylpropanoids Sinapylalkohol, einem Precursor der Ligninsynthese, 2 Methylierungsschritte. Der Sekundärmetabolismus ist ein energieaufwendiger Prozess und hohe Aktivität nicht permanent erforderlich. Eine wichtige Funktion ist die Abwehr von Fraßfeinden und Pathogenen. Junge Pflanzen benötigen häufig mehr Sekundärmetabolite, da mechanische Schutzsysteme, wie die Cuticula noch nicht ausreichend ausgebildet sind.

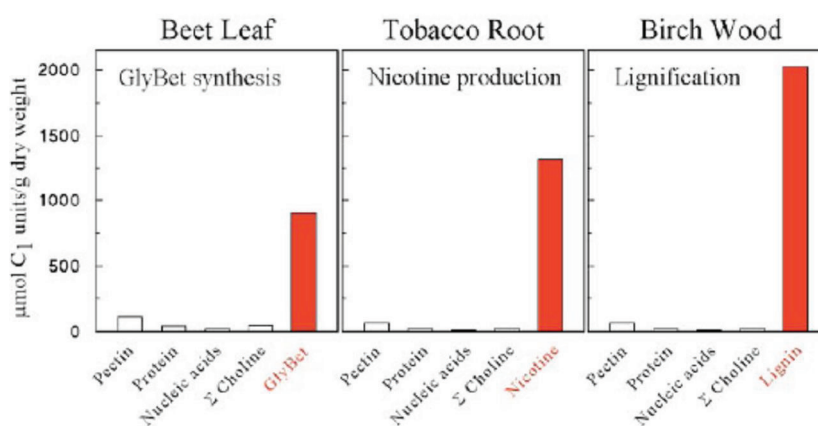


Abb. 7. C1-Bedarf für Verbindungen des Primär- und Sekundärmetabolismus. Für die Bildung sekundärer Pflanzenstoffe werden deutlich mehr C1-Verbindungen benötigt. Gly-Bet, Glycin-Betain. Aus: (Hanson and Roje 2001): One-Carbon Metabolism In Higher Plants.

Hanson und Roje (Hanson and Roje 2001) haben aus verschiedenen

Literaturquellen den C1-Bedarf für Methylierungen im Primär und Sekundärmetabolismus exemplarisch zusammengefasst (Abb. 7). Demnach entfällt für den Primärmetabolismus nur ein geringer Teil der C1-Verbindungen, während Sekundärmetabolite den Hauptanteil benötigen.

1.1.6. DNA-Methylierung und die Effekte auf die Genexpression

Ein weiteres Feld von großer Bedeutung ist die Modifizierung von DNA mit Methylgruppen. DNA-Methylierungen überziehen das gesamte Genom eines Organismus und entfallen daher in den Bereich der Epigenetik. Veränderungen der Umweltbedingungen oder der Eintritt in neue Entwicklungsstadien sind Auslöser von epigenetischen Effekten. Nicht alle Gene werden permanent benötigt, z.B. für Zelldifferenzierungsprozesse. Eine temporäre Inaktivierung der Genexpression einzelner Gene durch Modifikationen bestimmter Nukleotide, vorrangig in Promotorbereichen, ist daher von ökonomischer Bedeutung für die Zelle. In höheren Eukaryoten ist Cytosin das Ziel der Methylierung und Methyltransferasen sind die Enzyme, die die Übertragung einer Methylgruppe von SAM auf das 5C-Atom der Base katalysieren (Abb. 8). Gene bzw. genetische Steuerelemente können ausgehend von einem Ist-Zustand hyper- oder hypomethyliert sein. Hypermethylierte DNA steht dabei häufig im Zusammenhang mit einer Inaktivierung von Genen (Bender 2004).

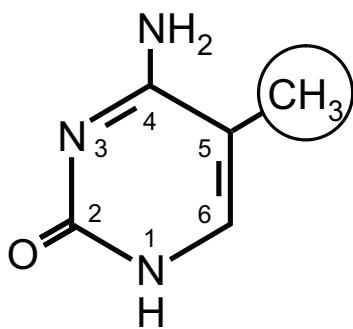


Abb. 8. Chemische Struktur von 5-Methylcytosin. Ein Methylrest wird auf das 5C-Atom übertragen.

1.1.7. SHMT-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana*

Die Untersuchungen an Serin-Hydroxymethyltransferase-Genen und deren Genprodukte wurden im Rahmen dieser Arbeiten an dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* vorgenommen. Die freie Verfügbarkeit der Genomsequenzinformationen (The Arabidopsis Genome Initiative 2000) und der Zugriff auf ständig erweiterte Datenbanken über das Internet (The Arabidopsis Information Ressource, www.arabidopsis.com; u.a.) haben diesen Vertreter der *Brassicaceae* zu einem der am meisten untersuchten Organismen in der Pflanzenforschung gemacht. Ziel der Forschungen ist langfristig das Verstehen metabolischer Prozesse und deren Regulation, sowie die Anwendung der Erkenntnisse auf andere Pflanzenspezies, wie z.B. die Kulturpflanzen Reis, Kartoffel und Mais.

Die Serin-Hydroxymethyltransferasen aus *Arabidopsis* werden durch eine Genfamilie, bestehend aus 7 Genen, kodiert, die auf 3 Chromosomen lokalisiert sind (Abb. 9). Anhand von *in-silico* Sequenzanalysen wurden Transit- oder Targetingpeptide in der Aminosäuresequenz identifiziert und durch PSORT und TargetP die wahrscheinlichste Lokalisation bestimmt (Tabelle 1.) (Bauwe and Kolukisaoglu 2003). Demnach sind die SHMT Isoformen 4 Kompartimenten zugeordnet: Mitochondrien, Cytosol, Chloroplasten und Zellkern.

Tabelle 1. Gene, die für die Isoformen der SHM in *Arabidopsis* kodieren und deren subzelluläre Kompartimentierung.

Protein	Gen	Protein	Aminosäuren	Lokalisation
AtSHM1	At4g37390	CAB80458	517	mitochondrial
AtSHM2	At5g26780	NP_568488	517	mitochondrial*
AtSHM3	At4g32520	NP_001119098	529	plastidär*
AtSHM4	At4g13930	NP_193129	471	cytosolisch*
AtSHM5	At4g13890	NP_193125	470	cytosolisch*
AtSHM6	At4g13930	NP_173621	599	nukleär*
AtSHM7	At1g13930	NP_564473	598	nukleär*

*Lokalisation beruht auf *in-silico* Vorhersagen

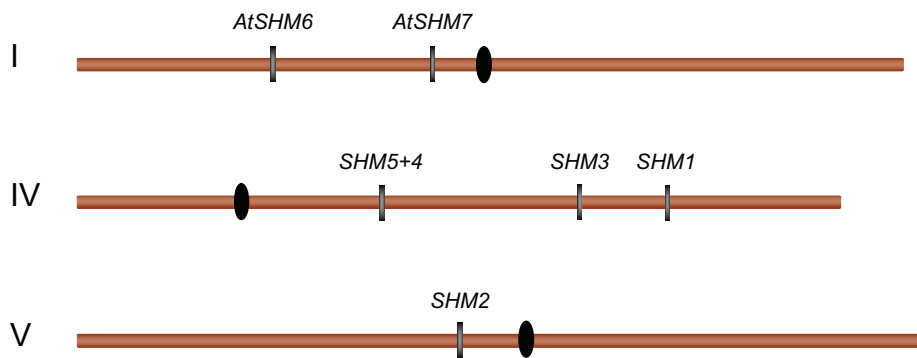


Abb. 9. Die Gene der 7 Isoformen der *AtSHM* sind auf 3 Chromosomen lokalisiert.

SHMT1/2

SHMT1 und SHMT2 repräsentieren die mitochondrialen SHMTs und weisen die höchsten Aminosäuresequenzidentitäten unter allen 7 Isoformen aus Arabidopsis auf (~88 %). Beide Proteine besitzen ein 30 Aminosäuren langes Transitpeptid für den Import in die Mitochondrien. Dennoch scheinen sie von unterschiedlicher Bedeutung zu sein. SHMT1 ist essentiell für den photorespiratorischen Glycolat-Weg. Zusammen mit dem GDC, sichert sie die Bildung von Serin aus Glycin und hält so den Serin-Glycin-Zyklus in Gang. Ein Funktionsverlust führt in Arabidopsis zu einem photorespiratorischen Phänotyp, der durch eine erhöhte CO_2 -Konzentration rückgängig gemacht werden kann. Als mögliche Ursache wird ein Anstau toxischer Intermediate diskutiert. Inwieweit die Akkumulierung von Glycin dabei eine Rolle spielt ist nicht klar.

Soweit bisher bekannt, kann SHMT2 den Funktionsverlust der SHMT1 nicht kompensieren (Voll et al. 2006) und scheint auch nicht von essentieller Bedeutung, da ein entsprechender *knock-out* keine sichtbaren phänotypischen Veränderungen zeigt.

SHMT3

SHMT3 stellt die einzige chloroplastidäre SHMT dar. Details über die Funktion dieses Isoenzym sind nicht bekannt. Es muss davon ausgegangen werden, dass die vorrangige Aufgabe die Bereitstellung von $\text{CH}_2\text{-THF}$ für den C1-Metabolismus in diesem Kompartiment ist.

SHMT4/5

Diese vermutlich im Cytosol lokalisierten Isoformen sind bisher ebenfalls nicht näher charakterisiert. Bis heute fehlen detaillierte Informationen über die enzymatische Aktivität und metabolische Funktion. Es ist jedoch anzunehmen, dass sie eine ähnlich bedeutende Funktion wie die mitochondriale SHMT1 inne haben. Viele Biosynthesen laufen auch im Cytosol ab und Methylierung ist eine wichtige Modifikation von Sekundärmetaboliten. Ein vollständiger Verlust der cytosolischen SHMT-Aktivität, müsste einen systemweiten Mangel an Methylgruppen (und anderen C1-Körpern) zur Folge haben.

SHMT6/7

Sequenzinformationen zufolge existieren in *Arabidopsis* zwei nukleäre SHMT-Isoformen. Details über die metabolische Funktion sind hier ebenfalls nicht bekannt. Neuburger *et al.* (Neuburger *et al.* 1996) haben im Zusammenhang mit der Erforschung der THF-Biosynthese SHMT Aktivitätsmessungen mit verschiedenen Zellorganellen durchgeführt. Für sämtliche vorhergesagten Lokalisationsorte der SHMT, einschließlich des Zellkerns, konnte eine entsprechende enzymatische Aktivität ermittelt werden. Es wird ein Bestandteil der Arbeit sein Funktion und Lokalisation von SHMT6 und SHMT7 nachzuweisen.

Mit Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) wurden für die Gene *SHM6* und *SHM7* Daten aus Microarray RNA-Chips zur transkriptionellen Regulation bei Stress ausgewertet. Demnach wird die Expression der *SHM6* durch Einwirkung biotischer und abiotischer Stressoren, nicht oder nur sehr geringfügig verändert. Für *SHM7* gibt es einige signifikante Änderungen der Expression unter Stress (Abb. 10). Eine Erhöhung der Transkriptmenge wird den Daten zufolge z.B. durch Salz und Trockenheit hervorgerufen. Diese Tatsache soll bei der funktionellen Charakterisierung der Gene mit berücksichtigt werden.

Salzstress und Trockenheit sind wesentliche Faktoren, die Wachstum und Produktivität landwirtschaftlich genutzter Kulturpflanzen beeinflussen. Zunehmende Versalzung von Böden und Wassermangel können zukünftig weltweit zu Ernteverlusten von bis zu 50 % führen (Wang *et al.* 2003). Vor diesem Hintergrund ist die Erforschung der Mechanismen, die zu Salztoleranz oder -resistenz führen von großer Bedeutung.

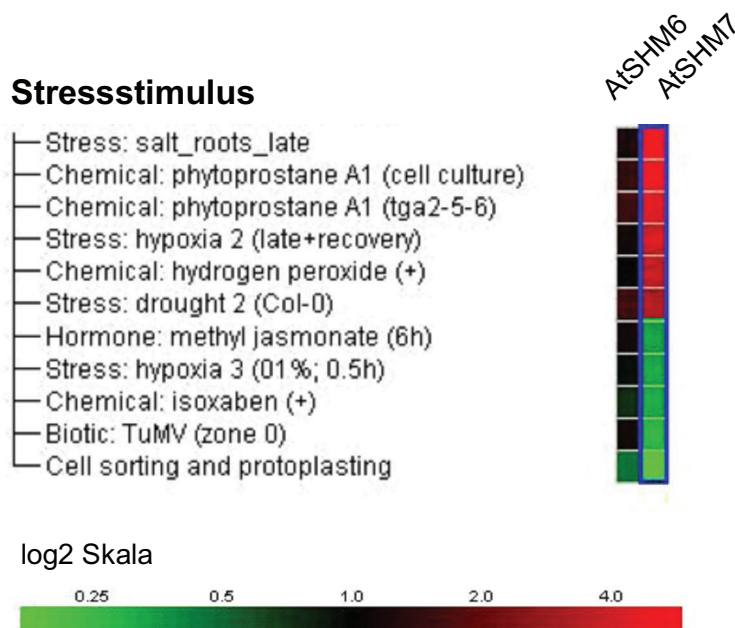


Abb. 10. Einfluss von Stressfaktoren auf die Expression der Gene *SHM6* und *SHM7*. Die Abbildung zeigt die Auswertung von Microarray-Daten der Genevestigator Datenbank (www.genevestigator.com). Salz und Trockenheit sind abiotische Faktoren, die die Expression von *SHM7* stimulieren. Die Expression von *SHM6* bleibt von Stressfaktoren weitgehend unbeeinflusst.

Nach bisherigem Kenntnisstand ist in Pflanzen für jedes Zellkompartiment, mit einem Bedarf an C1-Einheiten, die Anwesenheit mindestens einer SHMT erforderlich. Mitochondrien, Plastiden und Cytosol sind Orte von Biosynthesen, bei denen C1-Verbindungen verbraucht werden. Inwieweit der Zellkern ebenfalls, abseits von DNA-Transmethylierungsreaktionen, mit C1-Einheiten versorgt werden muss, ist bislang nicht untersucht. Neben *Arabidopsis* gibt es in den Genomen weiterer Pflanzenspezies, wie *Vitis vinifera*, *Populus tremuloides* oder *Oryza sativa*, Hinweise auf das Vorhandensein nukleärer SHMT. Dies zeigen *in-silico* Analysen der Aminosäuresequenzen. Alle tragen eine Sequenz nach dem Muster einer NLS (*nuclear localisation site*) (Fontes et al. 2003). Solche Erkennungssequenzen vermitteln den nukleären Import via Importin.

Der phylogenetische Stammbaum (Abb. 11) belegt, dass die höchsten strukturellen Ähnlichkeiten unter SHMTs eines Organelotyps zu finden sind. Er zeigt die Verwandtschaftsbeziehungen der SHMT untereinander.

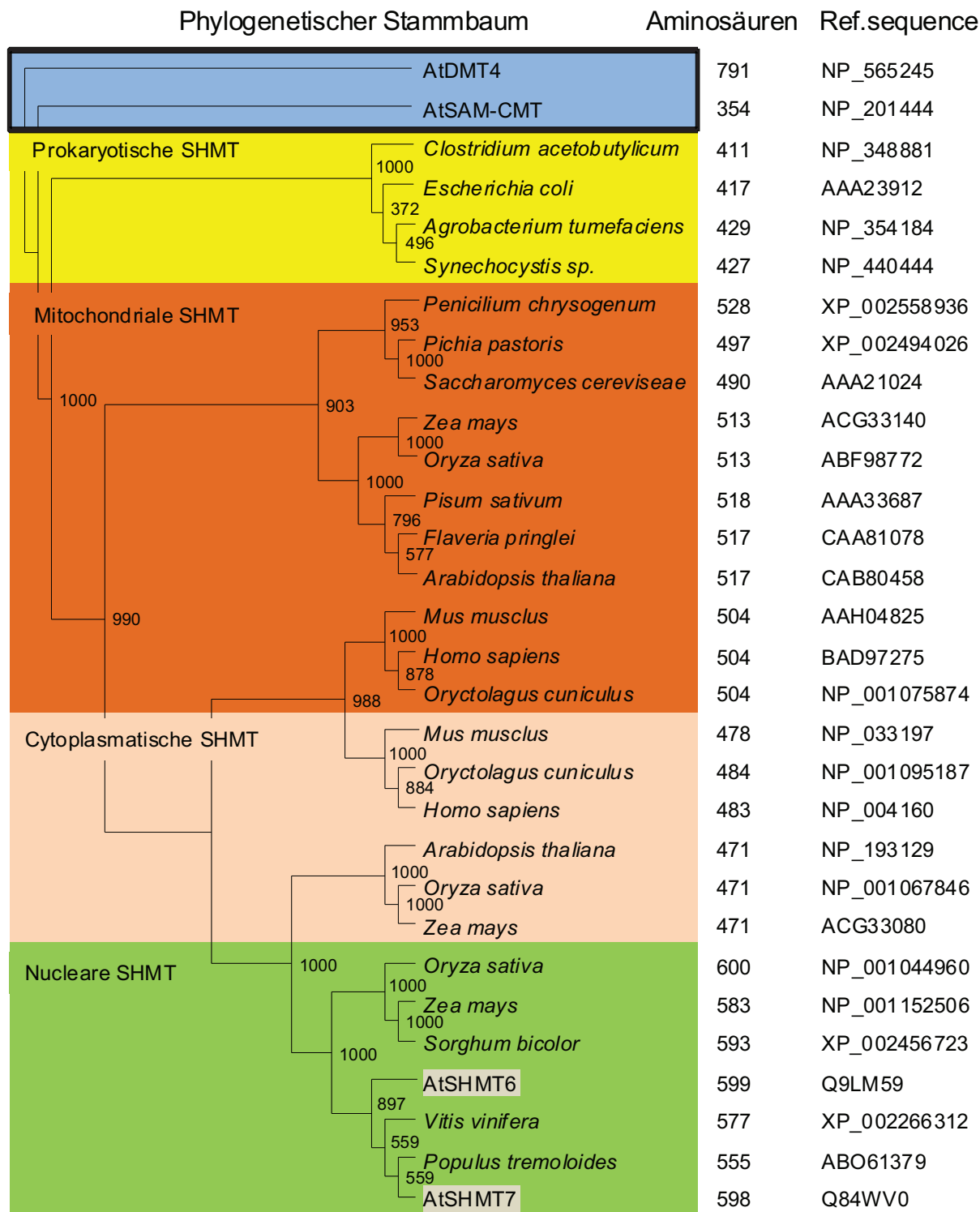


Abb. 11. Stammbaum (*neighbour-joining*) von SHMT unterschiedlicher Spezies auf Basis von Aminosäuresequenzen. SHMT6 und SHMT7 haben die größte verwandtschaftliche Nähe zu anderen putativ kernlokalisierten SHMT. Als Outgroup dient die DNA-Methyltransferase4 aus Arabidopsis (AtDMT4). AtSCMT, SAM-Carboxyl Methyltransferase. Programm:ClustalX1.8

1.2. Ziele der Arbeit

Mit dieser Arbeit sollen grundlegende Daten über Vorkommen und Funktion zweier putativer Serin-Hydroxymethyltransferasen gesammelt werden, die vermutlich im Zellkern von *Arabidopsis* lokalisiert sind. Durch die weitgehende Autonomie pflanzlicher Zellkompartimente bei der Beladung von Folaten mit C1-Körpern, kommt der Existenz von Serin-Hydroxymethyltransferasen hier eine besondere Bedeutung zu. Jedoch ist völlig offen in welcher Weise der Zellkern zum C1-Metabolismus beiträgt bzw. welche C1-Verbindungen hier tatsächlich benötigt werden. Eine Bereitstellung von C1-Einheiten für Transmethylierungsreaktionen der DNA nach dem Schema in Abb. 4 ist denkbar. Die Untersuchung der Lokalisation von SHMT6 und SHMT7, sowie die Bestätigung der enzymatischen Aktivität beider Proteine, sind wichtige Aspekte bei der Beantwortung der Frage, ob Pflanzen nucleäre SHMT benötigen.

Im Zellkern laufen wichtige Prozesse wie die DNA-Replikation und Transkription ab. Die dafür benötigten Komponenten müssen aus dem Cytosol importiert werden, da Zellkerne keine Orte von Biosynthesen komplexer Moleküle darstellen. Die Genexpression wird durch unterschiedliche Methylierungszustände regulatorischer Sequenzen beeinflusst. Es soll daher weiterhin untersucht werden, ob SHMT6 und SHMT7 auf diese Regulationsmechanismen Einfluss nehmen. Um die Rolle putativ kernlokalisierter SHMT für den pflanzlichen Stoffwechsel besser zu verstehen, sollen *knock-out* Mutanten mit Defekten in *SHM6* und *SHM7* herangezogen werden. Da keine Daten zur Funktion beider Gene vorliegen, dienen diese Mutanten dem grundlegenden Verständnis von Serin-Hydroxymethyltransferasen im Zellkern. Ein kombinierter Funktionsverlust beider Proteine ist von großer Wichtigkeit bei diesen Untersuchungen, da eine wechselseitige Komplementierung von SHMT6 und SHMT7 nicht ausgeschlossen werden kann. Es sollen daher entsprechende Mutanten erzeugt und Wachstumsparameter bestimmt werden. Ein Augenmerk liegt auf der Bestimmung von Metaboliten des Primärstoffwechsels. Sie können Auskunft geben über metabolische Netzwerke, an denen SHMT6 und SHMT7 beteiligt sind.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Grundchemikalien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem, Duchefa, Fluka, Merck, Roth, Serva, Sigma.

2.1.2. Enzyme

Tabelle 2. Liste der verwendeten Enzyme.

Enzym	Hersteller
T4-Ligase	Fermentas
RevertAid Minus MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas
DNA Phosphatase	Fermentas
Klenow-Fragment	Fermentas
RibnucleaseA	Fermentas
Restriktionsenzyme	Fermentas

2.1.3. Verwendete Kits und Fertiglösungen

Tabelle 3. Liste der Kits und Fertiglösungen.

Kit/Lösung	Hersteller, Verwendung
Imprint® Methylated DNA Quantification	Sigma; Quantifizierung des globalen Methylierungsstatus' chromosomaler DNA
NucleoSpin® ExtractII	Macherey und Nagel; Reinigung von DNA
NucleoSpin® RNA Plant	Macherey und Nagel; Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis</i>
Roti® Nanoquant	Carl Roth; Proteinquantifizierung
Taq PCR Mastermix	Qiagen; PCR

2.1.4. Software und Websites

DNA- und Proteinsequenzen wurden den folgenden Internetdatenbanken entnommen:

The Arabidopsis Genome Project (www.arabidopsis.org)

National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Informationen über Eigenschaften und Struktur von Protein- und DNA-Sequenzen stammten von:

Expert Protein Analysis System (Prosite, UniProt K) (<http://www.expasy.org>)

PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>)

Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>)

TargetP1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>)

2.1.5. Antibiotika

Tabelle 4. Verwendete Antibiotika und deren verwendete Endkonzentration.

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Gentamycin	50 µg/ml
Hygromycin	40 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Rifampicin	100 µg/ml
Streptomycin	10 µg/ml
Ticarcillin	250 µg/ml

2.1.6. Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab, Göttingen, durchgeführt. Ausgangsmaterial war jeweils etwa 500 ng DNA in 10 mM Tris-Puffer, pH 8,0, zusammen mit 15 pmol Oligonukleotiden. Die Auswertung erfolgte mit den Analysesoftwaren BioEdit und ClustalX1.8. Sequenzierungen wurden mit allen in dieser Arbeit hergestellten Konstrukten durchgeführt, um die korrekte *in-frame* Klonierung sicher zu stellen

2.1.7. Vektoren und Oligonukleotide

Eine Übersicht der verwendeten Vektoren und Oligonukleotide und deren Bezugsquelle sind im Anhang aufgelistet.

2.1.8. Marker und Standards

Die DNA- und Proteinstandards wurden von Fermentas bezogen. Individuelle Standards wurden mit Proteinen von SERVA hergestellt.

2.1.9. Organismen

Tabelle 5. Übersicht der verwendeten Organismen und Pflanzenlinien.

Organismus	Beschreibung/Genotyp	Ursprung
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia 0, Genotyp aller anderen Pflanzenlinien	SALK Kollektion
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>shm6-1</i> , T-DNA-Insertion	SALK050632
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>shm7-2</i> , T-DNA-Insertion	SALK118251
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>shm6+7</i> ; Kreuzung von <i>shm6-1</i> und <i>shm7-2</i>	Eigene Arbeit
<i>E.coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ^-	INVITROGEN
<i>E.coli</i> XI1 Blue	<i>endA1</i> <i>gyrA96</i> (nal ^R) <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> <i>glnV44</i> F'[::Tn10 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ (<i>lacZ</i>)M15] <i>hsdR17</i> (<i>r_K^-</i> <i>m_K</i> ⁺)	STRATAGENE
<i>E.coli</i> BL21(De) Gold	F- <i>dcm</i> ⁺ <i>Hte</i> <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> - <i>m_B</i> -) <i>gal I</i> (DE3) <i>endA</i> Tet ^r	STRATAGENE
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	pMP90 (pTiBo542_T-DNA)	

2.1.10. Medien und Medienzusätze für die Anzucht der Organismen

Im Folgenden sind die verwendeten Medien für das Wachstum von Bakterien und Pflanzen angegeben. Vorgenommene Änderungen an der Zusammensetzung wurden in der Versuchsbeschreibung vermerkt. Die Medien wurden mittels Autoklavieren sterilisiert und ausschließlich in steriler Umgebung verwendet.

Tabelle 6. Medien Medienzusätze für die Anzucht von Bakterien und Pflanzen.

Medium	Zusammensetzung
LB-Flüssigmedium	1 % Trypton 1 % NaCl 0,5 % Hefeextrakt pH 7,5; Autoklavieren
φ-broth-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt Autoklavieren 0,4 % MgSO ₄ 10 mM KCl
LB-Agar	LB-Flüssigmedium + 1,5 % Agar-Agar (w/v); Autoklavieren
YEB-Flüssigmedium	0,5 % Fleischextrakt 0,5 % Trypton 0,5 % Saccharose 0,25 % Hefeextrakt Autoklavieren
YEB-Agar	YEB-Flüssigmedium + 1,5 % Agar-Agar (w/v); Autoklavieren
½ MS-Agar	1,1 g/l MS-Salze und Vitamine 1 % Saccharose 1 % Agar-Agar pH ~5,8; Autoklavieren
TJB1	100mM RbCl 50mM MnCl 30mM K-Acetat 10mM CaCl 15% Glycerol pH 5,8; steril filtrieren
TJB2	10mM MOPS 10mM RbCl 75mM CaCl 15% Glycerol pH 7,0; steril filtrieren

2.2. Arbeiten mit Bakterien

2.2.1. Kulturbedingungen und Lagerung Bakterien

Sämtliche Bakterien wurden entweder im Schüttelinkubator oder im Inkubationsschrank kultiviert. Zum Zweck der Erhaltung und Neuanzucht lagerten die Bakterien bei maximal -70°C in einer 50 % (w/v) Glycerollösung.

***Escherichia coli* (E. coli)**

E. coli wurde, soweit nicht anders beschrieben in LB-Flüssigmedium und auf LB-Agarplatten bei 37 °C angezogen.

Agrobacterium tumefaciens

A. tumefaciens wurde, soweit nicht anders beschrieben, bei 28°C in YEB-Medium oder auf YEB-Agar kultiviert.

2.2.2. Messung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen

Bakterienwachstum wurde durch optische Dichtemessung bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Dazu wurde 1 ml Bakteriensuspension in Halbmikroküvetten gegen reines Medium als Blindwert photometrisch mit dem Varian Cary Bio50 UV/Vis Spektrophotometer vermessen.

2.2.3. Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation mit dem Bio-Rad *Micropulser* oder nach der Hitze-Schock-Methode (Hanahan 1983, Inoue et al. 1990) in Agrobakterien und *E. coli* transformiert.

Elektroporation von Bakterien

Bakterien wurden für die Elektroporation mit 10 % Glycerol kompetent gemacht. Ein Bakterienpellet wurde 2mal mit steriler 10 % Glycerollösung (auf Eis) gewaschen und anschließend in einem kleinen Volumen dergleichen Lösung aufgenommen und aliquotiert. Die Elektroporation wurde mit den Voreinstellungen des Bio-Rad *Micropulser* in Küvetten mit 1 mm Kondensatorabstand durchgeführt.

2.2.4. Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

Die Präparation von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mit Zellen einer Übernachtskultur. Dazu wurden etwa 5 ml steriles LB-Medium entweder mit 100 µl Vorkultur oder mit Zellmaterial einer Bakterienkolonie beimpft und angezogen (siehe 2.2.1).

Die Isolierung der Plasmide erfolgte anschließend durch alkalische Lyse nach einer modifizierten Methode von Birnboim (Birnboim 1983). Die Prozedur ist ausführlich bei Sambrook *et al* (Molecular Cloning: a laboratory manual, 2003) beschrieben.

2.2.5. Colony PCR

Die Colony-PCR wurde verwendet, um mit geringem Zeitaufwand eine größere Anzahl Bakterienkolonien auf das Vorhandensein der rekombinanten DNA in den Zellen zu überprüfen. Dabei wurden etwas Zellmaterial von einer Bakterienkolonie oder 10 µl aus einer Flüssigkultur in 40 µl Wasser gelöst und 15 min bei 95°C denaturiert. Nach Zentrifugieren für 5 min bei 16000 g wurden 2 µl vom Überstand in einer PCR eingesetzt.

2.3. Arbeiten mit Pflanzen

2.3.1. Sterilisieren von Pflanzensamen

Pflanzensamen wurden mit Natriumhypochlorit-Lösung (4% aktives Chlor; 0,1% Triton X-100) oberflächensterilisiert. Eine gewünschte Menge Samen wurde auf Filterpapier platziert und zunächst mit 70% Ethanol behandelt. Nachdem die Samen getrocknet waren, wurde 2 Mal mit Na-Hypochlorit sterilisiert. Es war darauf zu achten, dass sämtliche Samen mit Lösung bedeckt waren. Anschließend wurde nochmals mit 70% Ethanol gewaschen.

2.3.2. Wachstum von *Arabidopsis thaliana*

Je nach Anwendung wurden *Arabidopsis*-Pflanzen auf einem Erde-Vermiculitgemisch (4:1) oder steril auf ½ MS-Agar angezogen. Falls nicht anders vermerkt erfolgte die Anzucht in einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12h-12h bei 21°C bzw. 19°C und 40 % Luftfeuchtigkeit in einem klimatisierten Raum unter Leuchtstofflampen (ca. 100 µmol·m⁻²·s⁻¹). Alle Samen wurden vor der Keimung mindestens 48 Stunden bei 4 °C stratifiziert. Mindestens ein Mal pro Woche wurde mit 0,2 % Wuxal-Dünger im Gießwasser gedüngt.

2.3.3. Isolierung von DNA und RNA aus *Arabidopsis*

DNA-Isolierung

Hochmolekulare DNA aus Pflanzen wurde nach modifizierter CTAB-Methode (Murray and Thompson 1980) extrahiert.

RNA Isolierung

Gesamt-RNA wurde mit dem NucleoSpin® RNA Plant (Macherey&Nagel) aus bis zu 300 mg Blattmaterial extrahiert.

2.3.4. Transformation von Arabidopsis mittels Agrobakterien

Das Einbringen von Fremd-DNA in Arabidopsis erfolgte mittels Agrobakterien nach der *floral dip*-Methode (Bechtold et al., Clough and Bent). Hierfür wurden 10 ml YEB-Medium mit Zellmaterial des plasmidtragenden Agrobakterienstammes beimpft. Nach 48 h hatten sich die Zellen genügend vermehrt und konnten durch Zentrifugieren (15 min bei 3000 g) geerntet werden.

Das Transformationsmedium war eine 5 % Saccharoselösung, in dem die Zellen auf eine OD600 von 2,0 eingestellt wurden. Die Infiltration der noch geschlossenen Blüten mit Agrobakterien erfolgte durch Eintauchen der Blütenstände in die Bakteriensuspension für etwa 10 Sekunden. Dann wurden die Blüten von überschüssigem Medium befreit und abgedeckt über Nacht im Dunkeln stehen gelassen, ehe sie in die Klimakammer kamen.

2.3.5. Screening von Populationen transgener Pflanzen

Nach einer Pflanzentransformation wurden die erhaltenen Samen über Hygromycin enthaltenen ½-MS-Agar auf das Vorhandensein transgener Pflanzen untersucht (Harrison et al.). Solche Individuen wurden dann auf Erde umgesetzt und wie in 2.3.2 beschrieben weiter kultiviert. Der Nachweis des Transgens erfolgte in einer PCR mit DNA aus Blattmaterial der entsprechenden Pflanze.

2.3.6. Keimungstest

Zur Untersuchung der Keimung der Arabidopsis-Linien *shm6-1*, *shm7-2*, *shm6+7* und Col-0 Wildtyp wurden etwa 250 Samen oberflächensterilisiert einzeln und in regelmäßigem Abstand auf 3 Agarplatten, als Triplikate, platziert. Das Stratifizieren der Samen erfolgte im Dunkeln bei 4 °C für 6 Tage. Am 6. Tag während des ersten Drittels der Lichtperiode wurden die Platten horizontal unter eine Lichtbank, zu den in 2.3.2 beschriebenen Umweltbedingungen, gestellt. Die Keimung der Samen wurde in 24 h Intervallen dokumentiert. Als gekeimt galten alle Samen, deren Keimwurzel die Wurzelhülle vollständig durchbrochen hatte. In der Regel bedeutete dieses das

Auftreten einer sichtbaren Wurzel von etwa 1 mm Länge. Die Keimungsrate wurde definiert als das prozentuale Verhältnis gekeimter Samen zur Gesamtzahl der Samen.

2.3.7. Wurzelwachstums-Assay

Die Messung der Wurzellängen der Arabidopsis-Linien *shm6-1*, *shm7-2*, *shm6+7* und Col-0 Wildtyp erfolgte in Zeitintervallen von 3 Tagen und über einen Zeitraum von 15 Tagen nach erfolgter Keimung. Es wurden 4 Replikate mit je 13 Samen jeder Linie angefertigt. Die Umweltbedingungen waren wie in 2.3.2. beschrieben. Die Wurzellängen wurden unter einem Stereomikroskop (Olympus SZX9) mit Hilfe von Millimeterpapier bestimmt.

Die sterilisierten Samen wurden nebeneinander im oberen Drittel der mit 25 ml $\frac{1}{2}$ MS-Agar gefüllten Petrischale im gleichen Abstand zueinander platziert. Auf diese Weise stand den Wurzeln ausreichend Platz für das Wachstum zur Verfügung. Die Samen wurden für 6 Tage im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert und am Beginn der Lichtperiode vertikal unter eine Lichtbank gestellt.

2.3.8. Pflanzenanzucht zur Charakterisierung der *SHM6/7* T-DNA *knock-out*-Linien

Die Pflanzenanzucht für die Metabolit- und Methylierungsuntersuchungen, sowie die Fotodokumentation und Gaswechsellmessungen, erfolgten in einem CONVIRON Klimaschrank, bei folgenden Umweltbedingungen: Tag-Nacht-Rhythmus von 10 h/14 h; Lichtintensität von ca. $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Luftfeuchtigkeit von 40 %. Außerdem erhielten die Pflanzen bei jedem Gießvorgang 0,2 % Wuxaldünger. Für Salzstress wurde dem Gießwasser 100 mM NaCl zugegeben.

Die Samen der Linien Col-0 Wildtyp, *shm6-1*, *shm7-2* und *shm6+7* wurden sterilisiert auf Erde ausgesät und für 4 Tage stratifiziert. Nach 10 Tagen Wachstum bei einer Tag-Nachtlänge von 12/12h wurden die Töpfe in den CONVIRON Klimaschrank weitere 10 Tage kultiviert und schließlich Pflanzen jeder Linie im gleichen Entwicklungsstadium (10-12-Blattstadium) einzeln auf Erde umgesetzt. Während des Wachstums wurde durch Randomisieren und Rotation die Position jeder Pflanze in regelmäßigen Abständen variiert, um positionsbedingte Wachstumsunterschiede auszugleichen. Die Ernte der Rosettenblätter erfolgte nach weiteren 5 Wochen Wachstums. Die Blätter wurden sofort in flüssigen Stickstoff schock gefroren.

2.3.9. Aufarbeitung von Pflanzenmaterial für Aminosäureanalyse mittels HPLC

Für HPLC-Analysen wurde 100 mg Blattmaterial jeder Pflanze abgewogen und sehr fein unter Stickstoff zermörsert. Zur Extraktion der freien Aminosäuren diente 1 ml 80 % Ethanol. Das Gemisch wurde komplett homogenisiert und 1 Stunde mit einem Tischschüttler kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 16000g zentrifugiert. Der Überstand gelangte zur Vakuumtrocknung. Um die Aminosäuren wieder in Lösung zu bringen, wurden sie mit 1 ml 8 mM Na₂PO₄ (pH 6,8; +0,4 % Tetrahydrofuran) gelöst und nochmals zentrifugiert (10 min, 16000 g). Von diesem Überstand gelangte eine 1:50 Verdünnung zur HPLC, von dem 10 µl Injektionsvolumen mit 10 µl OPA (o-phthalaldehyd) derivatisiert wurden. Die Trennung und Quantifizierung der Aminosäuren ist bei Hagemann et al (Hagemann et al. 2005)

2.3.10. Extraktion von Komponenten des Primärstoffwechsels zur GC-MS-Analyse

Von den in 2.3.8 angezogenen Pflanzen wurde etwa 25 mg gefrorenes Blattmaterial unter Stickstoff aliquotiert und zusammen mit 600 µl N, N-Dimethylformamid mit einem Homogenisator mittels Glaskugeln vollständig homogenisiert. Dann folgte die Zugabe von 5 µl 2mg/ml ¹³C-Sorbitol (Sigma) und 400 µl HPLC-Wasser (Roth). Dieser Ansatz wurde mit einem Vortex gut vermischt und anschließend bei 4°C für 10 min geschüttelt. Nach Zentrifugieren für 8 min bei 20000 g wurde der Überstand abgenommen und in ein neuem Reaktionsgefäß mit 600 µl Xylen gemischt. Durch Zentrifugieren wurden die Phasen getrennt und von der wässrigen Phase 400 µl mit einer SpeedVac getrocknet. Diese Aliquots lagerten bis zur Verwendung bei max. -70°C unter Stickstoffgas. Vor der Derivatisierung wurden die Proben nochmals für 30 min Vakuum getrocknet. Anschließend folgten die Zugabe von 20 µl Methoxyaminhydrochlorid (40mg/ml in Pyridin), Schütteln für 90 min und kurzes Zentrifugieren. Im Anschluss daran wurden 180 µl MSTFA und 10 µl eines Alkanmixes hinzu gegeben und 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren (1 min, 16000g) waren die Proben bereit zur Analyse.

2.3.11. Isolierung von Protoplasten zur Mikroskopie

Protoplasten für die Mikroskopie wurden aus jungen Blättern transgener Arabidopsis-Pflanzen nach der Methode von Abel und Theologis (Abel and Theologis 1994) isoliert.

2.3.12. Histochemischer GUS-Assay

Pflanzenmaterial zur Analyse der GUS-Aktivität wurde mit X-Gluc-Puffer 10 min unter Vakuum infiltriert. Zur Färbung wurden die Proben bei 37 °C für 16 h inkubiert.

X-Gluc-Puffer:	100 mM	Na ₂ PO ₄ pH 7,0
	10 mM	EDTA, pH 8
	5 mM	K ₃ [Fe(CN) ₆]III
	5 mM	K ₄ [Fe(CN) ₆]II
	0,1 % (v/v)	Triton X-100
	1 mM	X-Gluc
	20 %	Methanol

2.4. Arbeiten mit DNA

2.4.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mit dem Lambda35 UV/Vis Spektrometer (Perkin Elmer) bei einer Absorption von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorption von 1 einem DNA- bzw. RNA-Gehalt von 50 mg/ml bzw. 40 mg/ml. Die Absorption wurde in einer 0,7 ml Micro-Quarzküvette (Roth) gegen Wasser als Nullwert gemessen.

2.4.2. Agarose-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden für die größenabhängige Trennung von DNA standardmäßig 1% ige Agarose-TAE-Gele in einer horizontalen Elektrophorese verwendet. Die Spannung betrug dabei 6 bis 8 V/cm. Die DNA wurde mit Hilfe von Ethidiumbromid in einer Konzentration von 50 ng/ml unter UV sichtbar gemacht.

2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion

Sämtliche PCR wurden mit dem Mastercycler ep und dem Px2 Thermal Cycler durchgeführt. Weiterhin wurde für die Herstellung der Reaktionsansätze ein Taq PCR Mastermix von Qiagen verwendet. Die Zyklenzahl betrug standardmäßig 36. Jeder Zyklus umfasste Denaturierung (20 sec, 94 °C), Annealing (20 sec, 55-58° C) und Elongation (1 min/kb DNA, 72 °C). Abweichungen im Text.

2.4.4. Reverse Transkription, cDNA-Synthese

Reverse Transkription, also das Umschreiben von RNA in den komplementären DNA Strang, wurde mit der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase von Fermentas durchgeführt. Da für die vorliegende Arbeit cDNA aus mRNA umzuschreiben war, dienten oligo-dT-Nukleotide als Startprimer, welche an den PolyA-Schwanz der mRNA banden. Etwa 2,5 µg RNA wurde so in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte nach Herstelleranleitung. Diese so genannte Erststrangsynthese diente als Matrice für die RT-PCR.

2.4.5. Reinigung von DNA mit dem NucleoSpin® Extract II Kit

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und die DNA-Gelextraktion erfolgte mit dem NucleoSpin® Extract II von MACHEREY-NAGEL gereinigt. Dazu wurde die entsprechende DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten Banden herausgeschnitten. Das Herstellerprotokoll diente als Vorlage für die Durchführung zur Aufreinigung.

2.4.6. Restriktion von DNA

Rekombinante Plasmide wurden routinemäßig auf die korrekte Insertion überprüft. Dazu wurden etwa 1-2 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtansatz von 20 µl mit 0,1-0,3 u der entsprechenden Restriktionsenzyme 2-12 Stunden verdaut. Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem Agrosegel. Für präparative Zwecke wurden die gewünschten Banden ausgeschnitten und gereinigt.

2.4.7. Ligation von DNA-Sequenzen

Standardmäßig enthielten Ligationsansätze Vektor- und Insert-DNA in einem Masseverhältnis von 1:3 bis 1:8, was einem Überschuss von Insert-DNA entspricht. In einem Gesamtansatz von 20 µl wurden zunächst Vektor- und Insert-DNA mit der entsprechenden Menge Wasser 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend kam der Ansatz auf Eis. Ligase und Ligationspuffer wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers hinzu gegeben. Für so genannte *blunt end*-Ligationen wurde das Vektor-Insert-Verhältnis auf bis zu 1:20 erhöht, was die Ausbeute rekombinanter Klone steigern sollte.

2.4.8. Klonieren einer DNA- Sequenz

DNA-Sequenzen wurden in dieser Arbeit standardmäßig nach folgendem Schema in einen Zielvektor integriert:

Zunächst wurde die gewünschte DNA-Sequenz in einer PCR mit genomischer DNA oder cDNA als Matrize amplifiziert. Die spezifischen Oligonukleotide enthielten bereits die für die Klonierung erforderlichen Restriktionsschnittstellen. Das PCR-Produkt wurde aus einem Agarosegel gereinigt und in den Vektor pGEM-T ligiert. Die Ligationsansätze wurden dann in *E. coli* Top10 oder XI1Blue-Zellen transformiert. Das *Screening* nach positiven Kolonien erfolgte auf Antibiotika enthaltenden LB-Agarplatten, sowie einer „Kolonie-PCR“, welche das integrierte DNA-Fragment nachweisen sollte. Die rekombinanten Plasmide wurden dann mittels einer Plasmidpräparation gewonnen und mit einer Restriktionsanalyse überprüft. Über die speziellen Restriktionsschnittstellen erfolgte die Rückgewinnung der DNA-Sequenz, die dann in den endgültigen Zielvektor ligiert wurde, welcher zuvor der gleichen Restriktion unterzogen wurde.

2.4.9. Southern-Blot

Das Southern-Blot Verfahren wurde verwendet, um Transkriptmengen verschiedener Gene mittels RT-PCR semi-quantitativ zu bestimmen. Dazu wurde RNA aus unterschiedlichen Organen von *Arabidopsis* isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matrize für eine PCR. Für den Abgleich der cDNA Konzentrationen wurde das *S16*-Gen der kleinen ribosomalen Untereinheit amplifiziert und die Banden im Agarosegel miteinander verglichen.

Zugleich musste die optimale Zyklenzahl der PCR ermittelt werden. Eine zu hohe Zyklenzahl bedeutete, dass die Produktmenge nicht mehr linear gebildet wird. Zu niedrige Zyklen konnten die Detektierung der PCR Produkte erschweren.

Southern-Blot und Hybridisierung mit DIG-Sonden

Für Transkriptbestimmung wurde RNA isoliert und in einer RT-PCR eingesetzt. Nach erfolgter PCR und Auftrennung der Produkte im Agarosegel wurde die DNA im Kapillarblotverfahren auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Als Medium diente 0,4 N NaOH-Lösung. Die Membran wurde mehrfach mit 10x SSC-Puffer gewaschen und dann mit UV Pulsen die DNA fixiert. Danach wurde mit Hybridisierungslösung prä-hybridisiert und schließlich die Hybridisierung mit der markierten DNA vorgenommen. Die Sondenherstellung erfolgte mit DNA-spezifischen Primern. Die zu untersuchenden Transkripte wurden als cDNA-Fragmente von etwa 500 bp amplifiziert. Sämtliche nachfolgenden Schritte von der Hybridisierung bis zur immunologischen Detektierung erfolgte nach Anleitung des DIG Easy Hyb der Firma ROCHE.

2.5. Arbeiten mit Proteinen

2.5.1. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen in wässriger Lösung wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Proteinlösungen wurden standardmäßig in einem Verhältnis von 1:50 mit Roth's Nanoquant (Arbeitslösung in einer 1:5 Verdünnung) verdünnt und 15 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Eine BSA-Eichreihe, aufgenommen in einem Konzentrationsbereich von 0,1 µg/µl bis 2 µg/µl, gab den Linearitätsfaktor für das Cary Bio50 UV/VIS Spektrophotometer wieder.

2.5.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt.

2.6. Heterologe Expression und Reinigung von Proteinen

2.6.1. Überexpression von SHMT in *E. coli*

In dieser Arbeit wurden Proteine mit den Vektoren pCAL-n und pHUE in *E. coli* heterolog überexprimiert. Die rekombinanten Proteine enthielten danach ein C-terminales Calmodulin-Bindeprotein (CBP) bzw. einen N-terminalen Histidin-Ubiquitin-tag zur Reinigung an Calmodulin bzw. NiNTA-Agarose.

Pilotexpression

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Proteine in *E. coli* überexprimieren lassen. Dazu wurden ausgehend von Einzelkolonien Übernachtskulturen angelegt. In jeweils 10 ml LB-Medium überführte Kulturen wuchsen bis zu einer OD von bis zu 1, ehe mit 0,4-1 mM IPTG die Expression induziert wurde. Als Negativkontrolle diente eine nicht induzierte Probe (ni). Die Zunahme der Expression konnte in einer Zeitreihe verfolgt werden. In der Regel war nach 3-4 Stunden induzierten Wachstums genügend rekombinantes Protein entstanden. Die Proben wurden dann zentrifugiert und das Pellet in 200 µl 1xLämmli-Puffer gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem SDS-haltigen Proteingel (2.5.2).

Bakterienwachstum in großer Kultur

Große Bakterienkulturen wurden benötigt, um große Mengen Protein zur Antigenproduktion oder zur Enzymaktivitätsmessung herzustellen. Kulturen mit 300 ml bis 1,5 ml LB-Medium wurden 1:100 mit einer Vorkultur beimpft und im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen. Dann wurde durch Zugabe des Induktors die Proteinsynthese gestartet. Nach 4-20 Stunden war genügend Protein gebildet worden und die Zellen konnten geerntet werden (Sigma 3K30 oder Sorvall RC6 Plus). Das Pellet konnte für einige Wochen bei -20°C gelagert werden.

2.6.2. Reinigung der Proteine nach Expression in *E. coli*

Die Aufarbeitung der Bakterienpellets und die Reinigung der Proteine über Ni-NTA erfolgte nach dem QIAexpress Protokoll (Qiagen). Abweichungen vom Protokoll betrafen Puffermengen und -zusammensetzung und dienten der Optimierung. Grundsätzlich wurden die Reinigungsschritte immer unter nicht-denaturierenden Bedingungen bei etwa 4 °C durchgeführt.

Proteine mit dem CBP als C-terminalen Affinitätstag wurden nach dem Stratagene-Protokoll zur Reinigung rekombinanter Proteine mit dem pCal-n Vektorsystem durchgeführt.

2.7. SHMT Assay

SHMT-Aktivität wurde nach einem Enzymtest von WEISSBACH und TAYLOR (Taylor and Weissbach 1965) mit radioaktiv markiertem Serin bestimmt. Das Prinzip basiert auf der Bildung eines Komplexes aus Formaldehyd, Dimedon und der Methylengruppe. Extrahiert in einem organischen Lösungsmittel wurde der radioaktive Zerfall mittels Szintillator bestimmt und der Umsatz an Serin berechnet.

Puffer und Lösungen

Reaktionspuffer:	400 mM	Kaliumphosphat pH 7,4
	1 mM	EDTA
	1,43 mM	2-Mercaptoethanol (14,3M)
	1 mM	DTT
	0,25 mM	Pyridoxalphosphat
	4 mM	Serin (kalt)
	8 μ M	3- ¹⁴ C-Serin ($1,05 \cdot 10^6$ dpm)
	2,5 mM	Kaliumchlorid
	2 mM	Tetrahydrofolat
1 M Natriumacetat pH 4,5		
0,4 M Dimedon in 50 % Ethanol		
Formaldehyd	83 μ l in 10 ml Wasser	
Szintillationsmix	667 ml	Toluen
	333 ml	Triton X-100
	4 g	PPO
	0,12g	Dimethyl-POPOP

Versuchsdurchführung

Das Enzym aus einer Proteinreinigung inkubierte zunächst ohne Tetrahydrofolat und Serin im Reaktionspuffer für 5 min bei 37 °C in einem Gesamtansatz von 1 ml. Danach folgte die Zugabe des 3-¹⁴C-Serins und Entnahme von 100 μ l als Nullwert. Dann startete die Reaktion mit Tetrahydrofolat. Weitere 100 μ l wurden im Abstand von drei mal 5 Minuten, also 15 min Gesamtzeit, entnommen. Die Proben wurden sofort in Natriumacetat gestoppt und mit Formaldehyd und Dimedon versetzt 10 min gekocht. Im Anschluss daran wurde der Dimedon-Komplex mit 3 ml Toluol extrahiert. Nach Zentrifugieren wurden 2 ml der organischen Phase zu 2 ml Szintillationsmix gegeben und im Szintillator vermessen.

2.8. Mikroskopische Techniken

2.8.1. Verwendete Mikroskope

Konfokale Lasermikroskopie

Mit dem Konfokalmikroskop Leica DM IRB wurden detailgetreue Abbildungen von zellulären Strukturen zur Proteinlokalisierung angefertigt. Zur Visualisierung von GFP, Hoechst und Chlorophyll wurden unterschiedliche Anregungswellenlängen und Emissionsspektren verwendet (Tabelle 7). Die detektierten Signale wurden überlagert, um

Tabelle 7. Übersicht der Anregungs- und Emissionswellenlängen von GFP, Hoechst und Chlorophyll.

	Anregung	Emission
GFP	488 nm	495-530 nm
Hoechst 33242	390 nm	450-490 nm
Chlorophyll	488 nm	590-680 nm

Fluoreszenzmikroskop Olympus BX41

Das Olympus BX41 wurde für die Untersuchungen zur Proteinlokalisierung (GFP) und der Promotoraktivität (GUS) durchgeführt. Die entsprechenden Aufnahmen wurden mit der Kamera Olympus E-330 angefertigt.

Tabelle 8. Überblick der Komponenten des BX41

Komponente	Bezeichnung
Okular	WH 10X-H/22
Objektiv1	Plan 4X/0,3
Objektiv2	U-Plan FI 10X/0,5
Objektiv3	U-Plan FI 20X/0,75
Objektiv4	U-Plan FI 400X/0,3
Langpassfilter	U-MNB2
Lichtquelle	U-LH100HG Quecksilberdampf Lampe
Stromversorgung	U-RFL-T <i>burner</i>
Kamera	Olympus E-330

Stereomikroskop SZX9

Dieses Stereomikroskop diente der Dokumentation zur histochemischen Analyse der Promotoraktivitäten mittels GUS. Außerdem fand es Verwendung bei der Begutachtung keimender Samen, sowie der Wurzellängenmessung.

Tabelle 9. Überblick der wichtigsten Komponenten des SZX9.

Komponente	Bezeichnung
Standkörper	SZX ILLD2-200
Okular	WH 10X-H/22
Objektiv	DF PLAPO 1X-2
Trinokular-Tubus	SZX-TR30
Kaltlichtquelle	KL1500 LCD
Kameradapter	U-TV1X-2
Kamera	NIKON coolpix995

3. Ergebnisse

3.1. Vergleichende Untersuchungen zur Struktur von SHMT6 und SHMT7

3.1.1. SHMT-Domäne und deren Strukturmerkmale

SHMT gehören zur α Klasse der PLP abhängigen Enzyme (Alexander et al. 1994) und innerhalb dieser Gruppe zur Superfamilie der Aspartat-Aminotransferasen. Sie stehen damit in einer Reihe mit dem P-Protein des Glycin Decarboxylase Multienzymkomplexes und den Threonin-Aldolase-like Proteinen. In den Aminosäuresequenzen aller bisher identifizierter SHMTs existieren hoch konservierte Sequenzmotive, welche als SHMT-Domäne die Grundlage zur Klassifizierung in einer SHMT-Familie bilden. Mit Pfam (Finn et al. 2010) und NCBI blastp wurden die Aminosäuresequenzen von SHMT6 und SHMT7 analysiert. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Ausführungen konnte die SHMT-Domäne in beiden Sequenzen identifiziert werden. AbbildungAbb. 12 zeigt dies schematisch.

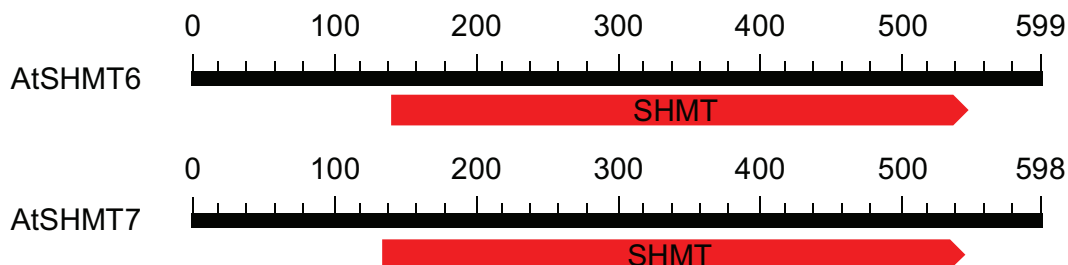



Abb. 12. Lage der SHMT-Domänen in den Aminosäuresequenzen von SHMT6 und SHMT7 aus Arabidopsis. Schwarze Boxen repräsentieren die Aminosäuresequenzen von SHMT6 und SHMT7. Als rote Box ist die SHMT-Domäne verzeichnet.

Als PLP abhängige Enzyme verfügen SHMTs über einen Bereich, welcher als PLP-Bindedomäne charakterisiert ist. Sie ist über Organismengrenzen hinweg hoch konserviert. Ein Lysinrest ist hier der Ort, an dem PLP gebunden wird (Tabelle 10). Der markierte Histidinrest zeichnet für die Reaktionsspezifität verantwortlich. Arginin ist vermutlich an der Bindung von THF beteiligt (Renwick et al. 1998).

Tabelle 10. PLP Bindedomäne im Ein-Aminosäure-Code in ausgewählten SHMT-Isoformen. PLP wird kovalent an einen Lysinrest (K) gebunden. Daneben ist Histidin (H) für die Reaktionsspezifität verantwortlich. Arginin (R) ist mutmaßlich an der Bindung von THF beteiligt (Renwick et al. 1998). SHMT1

Organismus	Protein	PLP-Bindedomäne	Lokalisation*
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB80458	DVVTTTTTHKSLRGPRGA	mitochondrial
	NP_193129	DVVTTTTTHKSLRGPRAG	cytosolisch
	NP_173621	DIVTSTTHKSLRGPRGG	nukleär
	NP_564473	DIVTSTTHKGLRGPRGG	nukleär
<i>Solanum tuberosum</i>	CAA81082	DVVTTTTTHKSLRGPRGA	mitochondrial
<i>Oryza sativa</i>	NP_001067846	DVVTTTTTHKSLRGPRAG	cytosolisch
	NP_001055615	DVVTSTTHKNLRGPRGG	nukleär
<i>Homo sapiens</i>	CAB54838	HVVTTTTTHKTLRGCRAG	cytosolisch
<i>Saccharomyces c.</i>	NP_013159	DIVTTTTTHKSLRGPRGA	cytosolisch
<i>E. coli</i>	AAA23912	HVVTTTTTHKTLAGPRGG	bakteriell



PLP-Bindestelle

* beruht teilweise auf *in-silico* Analysen.

Der Bereich der Sequenzidentitäten von SHMT verschiedener Spezies erstreckt sich von etwa 30 % zwischen *E. coli* und *Arabidopsis* SHMT6 bzw. SHMT7 bis zu ~90 % mitochondrialer pflanzlicher oder tierischer SHMT (ermittelt durch multiple Alignments der Aminosäuresequenzen mit ClustalX1.8). Wobei diese Werte näher zusammenrücken, wenn man Transitpeptide oder andere spezifische terminale Sequenzen unberücksichtigt lässt. Die in *Arabidopsis* vorhergesagten SHMT-Isoformen sind zwischen ~50 % und ~90 % identisch zueinander. Wie aus Abbildung Abb. 13 hervorgeht, finden sich die höchsten Übereinstimmungen zwischen SHMT verschiedener Spezies in jenem Sequenzbereich, welcher die SHMT-Domäne bildet und charakteristisch für die gleichnamige Familie ist. Die schwarze Umrandung zeigt Bereiche mit Sequenzidentitäten. Die SHMT-Domäne ist etwa 400 Aminosäuren lang. Außerhalb befindliche Sequenzabschnitte dienen z.B. dem Targeting, also der Translokation in ein Zellkompartiment oder besitzen eine andere nicht näher charakterisierte Funktion.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
AtSHM1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtSHM2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtSHM3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtSHM4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtSHM5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtSHM6	MDR-IAQSDLSLGFSSHALPLPH-PRPIADDSITLQIDSSFRPSSN----	PMPPVPLQLLEQRFDVTGSCSRVVEEDDEVVGDND	DD						
AtSHM7	MDLSRSOTNFGFGCSHASMTPTPTPRPIADDSINLOVDOSFRSLPT----	TFSPIPLOLLEOKAEKT----	TTVDEPKKDGGGG						
StmSHM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
hcSHM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EcSHM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
AtSHM1	---MAMAMALRLSSSIDKPIRLIR--STSCYMSSLPSEAVDEKERSRVTPKQLNAPLEEDVPEIADIIIEHAKRCWKQLELIFSEN								
AtSHM2	---MALALRLSSSVKPKISLLSSNGSLRFMSSSLTAAMAESEKSRSSWIKQLNASLDEIDPEVADIIIEHAKRCWKQLELIFSEN								
AtSHM3	PPVTKFSQQLKFNISKPRSSFLKRNVLVSEMRASSVSLPNVEISSK----	EIPFEDYGLGEVDPEVRTIIIEKRCRFFSELELIASENF							
AtSHM4	-----	MEPVSSWGNTSLVSDPEIIDLIEKEKRCRCRGIELIASNF							
AtSHM5	-----	MEPVSSWGNTSLVSDPEIIDLIEKEKRCRCRGIELIASNF							
AtSHM6	DQREEEQFILLGHPMKLKRGRGNSYSLASSSPCKRFVVDSGIESRRV--VRAWQNSIEEDPEIIEHAKRCRCRGIELIASNF								
AtSHM7	-QKEDHFRILGHHMCLKRQRDCPLLLOSTKHPKRSSIGDSLESRAA--VRAWGDQPIHLADPEIIEHAKRCRCRGIELIASNF								
StmSHM	---MAMALRLSLATVDKPVKSLYNGGSLYYMSSLPNEAVDYDEKSGVAPKQLNAPLEEDVPEIADIIIEHAKRCWKQLELIFSEN								
hcSHM	-----	MTMPVNGAKHDADLWSSHDKMLAQPLKDSDEVEYNIIEKESRCRCRGIELIASNF							
EcSHM	-----	MLKREMNIAADVLAELWQAMCEKVRCEEHIELIASNF							
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
AtSHM1	TSVSVNIMAGSVMTNINYSYEGYPGARYYGGNEYIDMAETLCCKRALEAFCLDPKMGVNVQPLSGSPANFVYVYALLHHERIMADLPHG								
AtSHM2	TSVSVNIMAGSVMTNINYSYEGYPGARYYGGNEYIDMAETLCCKRALEAFCLDPKMGVNVQPLSGSPANFVYVYALLHHERIMADLPHG								
AtSHM3	TSFAVMEALGSLTNINYSYEGYPGARYYGGNEYIDMAETLCCKRALEAFCLDPKMGVNVQPLSGSPANFVYVYALLHHERIMADLPHG								
AtSHM4	TSFAVMEALGSLTNINYSYEGYPGARYYGGNEYIDMAETLCCKRALEAFCLDPKMGVNVQPLSGSPANFVYVYALLHHERIMADLPHG								
AtSHM5	TSFAVMEALGSLTNINYSYEGYPGARYYGGNEYIDMAETLCCKRALEAFCLDPKMGVNVQPLSGSPANFVYVYALLHHERIMADLPHG								
AtSHM6	VCAVMEALGSLTNINYSYEGYPGARYYGGNEYIDMAETLCCKRALEAFCLDPKMGVNVQPLSGSPANFVYVYALLHHERIMADLPHG								
AtSHM7	VCAVMEALGSLTNINYSYEGYPGARYYGGNEYIDMAETLCCKRALEAFCLDPKMGVNVQPLSGSPANFVYVYALLHHERIMADLPHG								
StmSHM	TSVSVNIMAGSVMTNINYSYEGYPGARYYGGNEYIDMAETLCCKRALEAFCLDPKMGVNVQPLSGSPANFVYVYALLHHERIMADLPHG								
hcSHM	TSFAVMEALGSLTNINYSYEGYPGARYYGGNEYIDMAETLCCKRALEAFCLDPKMGVNVQPLSGSPANFVYVYALLHHERIMADLPHG								
EcSHM	TSFAVMEALGSLTNINYSYEGYPGARYYGGNEYIDMAETLCCKRALEAFCLDPKMGVNVQPLSGSPANFVYVYALLHHERIMADLPHG								
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
AtSHM1	CHLSHGYCT-DTKKISAMSIFFETMPYRLDESTGYIDYDQEKSMILFRPKLIAGASAYARLYDYARIRKVCNKHAVMLIDAHISGL								
AtSHM2	CHLSHGYCT-DTKKISAMSIFFETMPYRLDESTGYIDYDQEKSMILFRPKLIAGASAYARLYDYARIRKVCNKHAVMLIDAHISGL								
AtSHM3	CHLSHGYCT-DTKKISAMSIFFETMPYRLDESTGYIDYDQEKSMILFRPKLIAGASAYARLYDYARIRKVCNKHAVMLIDAHISGL								
AtSHM4	CHLSHGYCT-DTKKISAMSIFFETMPYRLDESTGYIDYDQEKSMILFRPKLIAGASAYARLYDYARIRKVCNKHAVMLIDAHISGL								
AtSHM5	CHLSHGYCT-DTKKISAMSIFFETMPYRLDESTGYIDYDQEKSMILFRPKLIAGASAYARLYDYARIRKVCNKHAVMLIDAHISGL								
AtSHM6	CHLSHGYCT-DTKKISAMSIFFETMPYRLDESTGYIDYDQEKSMILFRPKLIAGASAYARLYDYARIRKVCNKHAVMLIDAHISGL								
AtSHM7	CHLSHGYCT-DTKKISAMSIFFETMPYRLDESTGYIDYDQEKSMILFRPKLIAGASAYARLYDYARIRKVCNKHAVMLIDAHISGL								
StmSHM	CHLSHGYCT-DTKKISAMSIFFETMPYRLDESTGYIDYDQEKSMILFRPKLIAGASAYARLYDYARIRKVCNKHAVMLIDAHISGL								
hcSHM	CHLSHGYCT-DTKKISAMSIFFETMPYRLDESTGYIDYDQEKSMILFRPKLIAGASAYARLYDYARIRKVCNKHAVMLIDAHISGL								
EcSHM	CHLSHGYCT-DTKKISAMSIFFETMPYRLDESTGYIDYDQEKSMILFRPKLIAGASAYARLYDYARIRKVCNKHAVMLIDAHISGL								
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
AtSHM1	VAAQVWPFPPFADVVTTTTHKSLRGPRGAMIFRKQKREIMRQG-----	KEVLYDFEDKINQAVFPGLQCGPHNHITIGLAVALR							
AtSHM2	VAAQVWPFPPFADVVTTTTHKSLRGPRGAMIFRKQKREIMRQG-----	KEVLYDFEDKINQAVFPGLQCGPHNHITIGLAVALR							
AtSHM3	VAAQVWPFPPFADVVTTTTHKSLRGPRGAMIFRKQKREIMRQG-----	KEVLYDFEDKINQAVFPGLQCGPHNHITIGLAVALR							
AtSHM4	VAAQVWPFPPFADVVTTTTHKSLRGPRGAMIFRKQKREIMRQG-----	KEVLYDFEDKINQAVFPGLQCGPHNHITIGLAVALR							
AtSHM5	VAAQVWPFPPFADVVTTTTHKSLRGPRGAMIFRKQKREIMRQG-----	KEVLYDFEDKINQAVFPGLQCGPHNHITIGLAVALR							
AtSHM6	VAAQVWPFPPFADVVTTTTHKSLRGPRGAMIFRKQKREIMRQG-----	KEVLYDFEDKINQAVFPGLQCGPHNHITIGLAVALR							
AtSHM7	VAAQVWPFPPFADVVTTTTHKSLRGPRGAMIFRKQKREIMRQG-----	KEVLYDFEDKINQAVFPGLQCGPHNHITIGLAVALR							
StmSHM	VAAQVWPFPPFADVVTTTTHKSLRGPRGAMIFRKQKREIMRQG-----	KEVLYDFEDKINQAVFPGLQCGPHNHITIGLAVALR							
hcSHM	VAAQVWPFPPFADVVTTTTHKSLRGPRGAMIFRKQKREIMRQG-----	KEVLYDFEDKINQAVFPGLQCGPHNHITIGLAVALR							
EcSHM	VAAQVWPFPPFADVVTTTTHKSLRGPRGAMIFRKQKREIMRQG-----	KEVLYDFEDKINQAVFPGLQCGPHNHITIGLAVALR							
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
AtSHM1	QANTPEYKAYCDQVLSNSAKFA-----	QTLNIRGMYLVSGGTDNHLVLVNLKPKGIDGSRVEKVLDAVHIAANKNTVPG							
AtSHM2	QANTPEYKAYCDQVLSNSAKFA-----	QTLNIRGMYLVSGGTDNHLVLVNLKPKGIDGSRVEKVLDAVHIAANKNTVPG							
AtSHM3	QANTPEYKAYCDQVLSNSAKFA-----	QTLNIRGMYLVSGGTDNHLVLVNLKPKGIDGSRVEKVLDAVHIAANKNTVPG							
AtSHM4	QANTPEYKAYCDQVLSNSAKFA-----	QTLNIRGMYLVSGGTDNHLVLVNLKPKGIDGSRVEKVLDAVHIAANKNTVPG							
AtSHM5	QANTPEYKAYCDQVLSNSAKFA-----	QTLNIRGMYLVSGGTDNHLVLVNLKPKGIDGSRVEKVLDAVHIAANKNTVPG							
AtSHM6	QANTPEYKAYCDQVLSNSAKFA-----	QTLNIRGMYLVSGGTDNHLVLVNLKPKGIDGSRVEKVLDAVHIAANKNTVPG							
AtSHM7	QANTPEYKAYCDQVLSNSAKFA-----	QTLNIRGMYLVSGGTDNHLVLVNLKPKGIDGSRVEKVLDAVHIAANKNTVPG							
StmSHM	QANTPEYKAYCDQVLSNSAKFA-----	QTLNIRGMYLVSGGTDNHLVLVNLKPKGIDGSRVEKVLDAVHIAANKNTVPG							
hcSHM	QANTPEYKAYCDQVLSNSAKFA-----	QTLNIRGMYLVSGGTDNHLVLVNLKPKGIDGSRVEKVLDAVHIAANKNTVPG							
EcSHM	QANTPEYKAYCDQVLSNSAKFA-----	QTLNIRGMYLVSGGTDNHLVLVNLKPKGIDGSRVEKVLDAVHIAANKNTVPG							
	560	570	580	590	600	610	620	630	640
AtSHM1	D-VSALVPGGIRIGTPALTSRGFVEDDFAKVAEYFDRAVITLAKVSESAQ-----	GTMLKDFVSAMESSST-IQSHIAKLKHEVEEFYAK							
AtSHM2	D-VSALVPGGIRIGTPALTSRGFVEDDFAKVAEYFDRAVITLAKVSESAQ-----	GTMLKDFVSAMESSST-IQSHIAKLKHEVEEFYAK							
AtSHM3	D-VSALVPGGIRIGTPALTSRGFVEDDFAKVAEYFDRAVITLAKVSESAQ-----	GTMLKDFVSAMESSST-IQSHIAKLKHEVEEFYAK							
AtSHM4	D-VSALVPGGIRIGTPALTSRGFVEDDFAKVAEYFDRAVITLAKVSESAQ-----	GTMLKDFVSAMESSST-IQSHIAKLKHEVEEFYAK							
AtSHM5	D-VSALVPGGIRIGTPALTSRGFVEDDFAKVAEYFDRAVITLAKVSESAQ-----	GTMLKDFVSAMESSST-IQSHIAKLKHEVEEFYAK							
AtSHM6	D-VSALVPGGIRIGTPALTSRGFVEDDFAKVAEYFDRAVITLAKVSESAQ-----	GTMLKDFVSAMESSST-IQSHIAKLKHEVEEFYAK							
AtSHM7	D-VSALVPGGIRIGTPALTSRGFVEDDFAKVAEYFDRAVITLAKVSESAQ-----	GTMLKDFVSAMESSST-IQSHIAKLKHEVEEFYAK							
StmSHM	D-VSALVPGGIRIGTPALTSRGFVEDDFAKVAEYFDRAVITLAKVSESAQ-----	GTMLKDFVSAMESSST-IQSHIAKLKHEVEEFYAK							
hcSHM	D-VSALVPGGIRIGTPALTSRGFVEDDFAKVAEYFDRAVITLAKVSESAQ-----	GTMLKDFVSAMESSST-IQSHIAKLKHEVEEFYAK							
EcSHM	D-VSALVPGGIRIGTPALTSRGFVEDDFAKVAEYFDRAVITLAKVSESAQ-----	GTMLKDFVSAMESSST-IQSHIAKLKHEVEEFYAK							

Abb. 13. Aminosäurealignment von Mitgliedern der SHMT-Familie. Arabidopsis (At, vgl. Tabelle 1), Kartoffel (StmSHM, mitochondrial, CAA81082), Mensch (hcSHM, *human cytosolic*, NP_004160) und *E. coli* (EcSHM, AAA23912). Die schwarz umrandeten Sequenzbereiche repräsentieren Sequenzidentitäten und bilden die SHMT-Domäne. Die letzten 6 bis 16 Aminosäuren wurden aus Platzgründen weggelassen. Rot umrandet sind wichtige Aminosäuren, welche Struktur und Funktion betreffen. Aminosäuren und deren Position in der hcSHM sind darüber in orangen Boxen dargestellte. Aminosäuren, die blau hervorgehoben sind, stellen Abweichungen von der hcSHM dar. Alignment mit ClustalX1.8 generiert.

SHMT kommen als Dimere und Tetramere vor. Die Tetramerstruktur wird durch zwei „tight dimers“ gebildet (Renwick et al. 1998). Dabei lagern sich immer zwei Monomere (A und D, sowie B und C) zu einem Dimer zusammen. Diese Struktur wurde von Renwick et al anhand von Kristallisationsstudien mit humaner cytosolischer SHMT (hcSHM) aufgeklärt. Dabei wurden einige, die Struktur und Funktion betreffende, essentielle Aminosäuren identifiziert. Diese liegen innerhalb der SHMT-Domäne. In der hcSHM ist ein His135 essentiell für die Ausbildung der Tertiärstruktur. Mutationen in der Sequenz führten zum Verlust des Tetramers. Wie in dem Aminosäurealignment in Abb. 13 zu erkennen ist, stehen an den betreffenden Stellen bei SHMT6, SHMT7 und *E. coli* Glycinreste. Von der *E. coli* SHMT weiß man, dass sie ausschließlich als Dimer vorkommt (Schirch et al. 1985). Man kann spekulieren, ob SHMT6 und SHMT7 ebenfalls nur in der Dimerform vorliegen. Betrachtet man die Sequenz 67 Aminosäuren aufwärts, so stehen dort 2 Histidine isoliert. In den Aminosäuresequenzen anderer putativer kernlokalisierter SHMT stehen an den betreffenden Stellen ebenfalls Histidine. In keiner anderen SHMT konnten diese ausgemacht werden. Möglicherweise wird die Tetramerstruktur dieser SHMTs durch die weiter N-terminal liegenden Histidineseite gebildet.

Weitere konservierte Aminosäurereste sind in Abb. 13 orange hervorgehoben. Sie stehen in Verbindung mit der katalytischen Funktion und bilden das aktive Zentrum. In der hcSHM sind dies Tyr73, His135, His148, His151, Ser203, Asp228, Ala230 His231, K257, Gly303, Arg402 (Renwick et al. 1998). Mit Ausnahme der SHMT5, welche statt Ser203 ein Tyr besitzt, SHMT6 mit einem Gln anstelle des His231 und dem bereits erwähnten His135, stimmen alle Aminosäuren an entsprechender Stelle exakt überein. Weitergehende Informationen sind bei Renwick et al zu entnehmen.

Die hier aufgezeigten strukturellen Identitäten bzw. Ähnlichkeiten belegen die enge Verwandtschaft der Mitglieder der SHMT-Familie zueinander. Sowohl pflanzliche, als

auch tierische und bakterielle SHMT stimmen in den wichtigsten Strukturmerkmalen überein.

3.1.2. Strukturbesonderheiten von SHMT6 und SHMT7

Nuclear localisation sequence (NLS)

Anhand von *in-silico* Sequenzanalysen mit einschlägigen Programmen zur Vorhersage der Kompartimentierung von Proteinen, konnten SHMT6 und SHMT7 als Kandidaten für kernlokalisierte SHMT identifiziert werden. Mit PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>) werden beide Proteine dem Zellkern zugeordnet. SubLocV1.0 bestätigt dies für SHMT6, gibt jedoch für SHMT7 auch das Mitochondrium als möglichen Lokalisationsort an. Die Aminosäuresequenzen beider Proteine offenbaren zudem eine *nuclear localisation sequence* (NLS), so dass eine Kernlokalisierung wahrscheinlich ist.

Tabelle 11. NLSs in pflanzlichen SHMTs. Die großen Ähnlichkeiten zu den Vergleichssequenzen sind ein Indiz für die Kernlokalisierung dieser Proteine.

Organismus	Protein	monopartite NLS	bipartite NLS
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SHMT6	KPKK	KKNAKALASALISRKCK
	SHMT7	(KIRK) *	KKNAQALAAALLRRKCR
<i>Oryza sativa</i>	NP_001044960	KRPRR	KKNAQALASALLRRKCR
<i>Populus tremuloides</i>	ABO61379	KRPR	RKNAQALASALLKRKCR
<i>Ricinus communis</i>	XP_002513846	(KSRK) *	KKNARTLASALLRRKCR
<i>Sorghum bicolor</i>	XP_002456723	KRPRR	KKNAQALASALLRRKCR
<i>Vitis vinifera</i>	XM_002285787	KRPR	KKNAQALAAALLRKSC
<i>Zea mays</i>	NP_001152506	KRPRR	KKNAQALASALLRRKCR
SV40 T-Antigen	NP_043127	PKKRK	XXXXXXXXXXXXXXXXXX
Konsensus nach Fontes et al.			KR X ₁₀₋₁₂ KRXK

* abweichende Sequenzmotive.

Nach Fontes et al (Fontes et al. 2003) kommen basische Aminosäuren als Kernlokalisierungssignal in Frage. Eine monopartite NLS, abgeleitet vom Simian Virus 40 T-Antigen, setzt sich aus einem Cluster von Arginin- (R) und/oder Lysinresten (K) zusammen.

Bipartite NLSs bestehen aus zwei durch einen variablen Spacer getrennte Cluster basischer Aminosäuren mit folgender Konsensussequenz KR-X₁₀₋₁₂-KRRK (Tabelle 11). NLSs sind Sequenzmotive, die mit dem *nuclear import factor* Importin

interagieren und so den Import in den Zellkern vermitteln. Die Tabelle 11 zeigt NLSs, die in den Aminosäuresequenzen verschiedener SHMT-Isoformen gefunden wurden. Die Mehrheit davon trägt eine bipartite und mindestens eine monopartite NLS. Beide Sequenzmotive zeigen dabei starke Ähnlichkeiten zum SV40 T-Antigen und der von Fontes vorgeschlagenen Konsensussequenz. SHMT6 trägt 63 Aminosäuren vor der bipartiten eine monopartite NLS. Für SHMT7 sagt PSORT keine solche Sequenz voraus. An entsprechender Stelle existiert jedoch ebenfalls eine Sequenz aus Lysin- und Argininresten, die statt Prolin Isoleucin beinhaltet (in Tabelle 11 mit * markiert).

Bei der Suche nach putativen kernlokalisierten SHMT mit NCBI blastp konnten nur für Pflanzen Sequenzen mit NLS gefunden werden. In Vertebraten und Hefen existieren nur mitochondriale und cytosolische SHMT. Das Vorkommen von SHMT im Zellkern ist demnach auf pflanzliche Spezies beschränkt.

N-terminale extensive Sequenz

Mit Pfam wird der Beginn der SHMT-Domäne für SHMT6 und SHMT7 an die Aminosäurepositionen 142 bzw. 138 gelegt (vgl. auch Abb. 13). Damit verbleibt N-terminal ein etwa 140 Aminosäuren langer Sequenzbereich von bisher unbekannter Funktion. Vergleichbare Regionen finden sich in allen putativ kernlokalisierten SHMTs. Die Länge variiert dabei von 100 bis 140 Aminosäuren.

Über die exakte Funktion kann nur spekuliert werden. Chloroplastidäre, peroxisomale oder mitochondriale Targetingsequenzen wurden nicht gefunden. Bei der Mehrheit dieser untersuchten SHMT war eine monopartite NLS in diesem Sequenzbereich zu finden (Abb. 14). Auch SHMT6 und SHMT7 besitzen Regionen mit basischen Aminosäureresten hier. Diese entsprechen jedoch nicht dem herkömmlichen Muster der NLS des Typs SV40 T-Antigen. Man kann feststellen, dass zumindest für eine Reihe von SHMTs eine solche N-terminale Sequenz eine bekannte Funktion erfüllt.

Weitere bekannte Domänen oder Sequenzmotive dieses N-terminalen Sequenzabschnittes konnten mit Pfam, PSORT und NCBI blastp nicht gefunden werden.

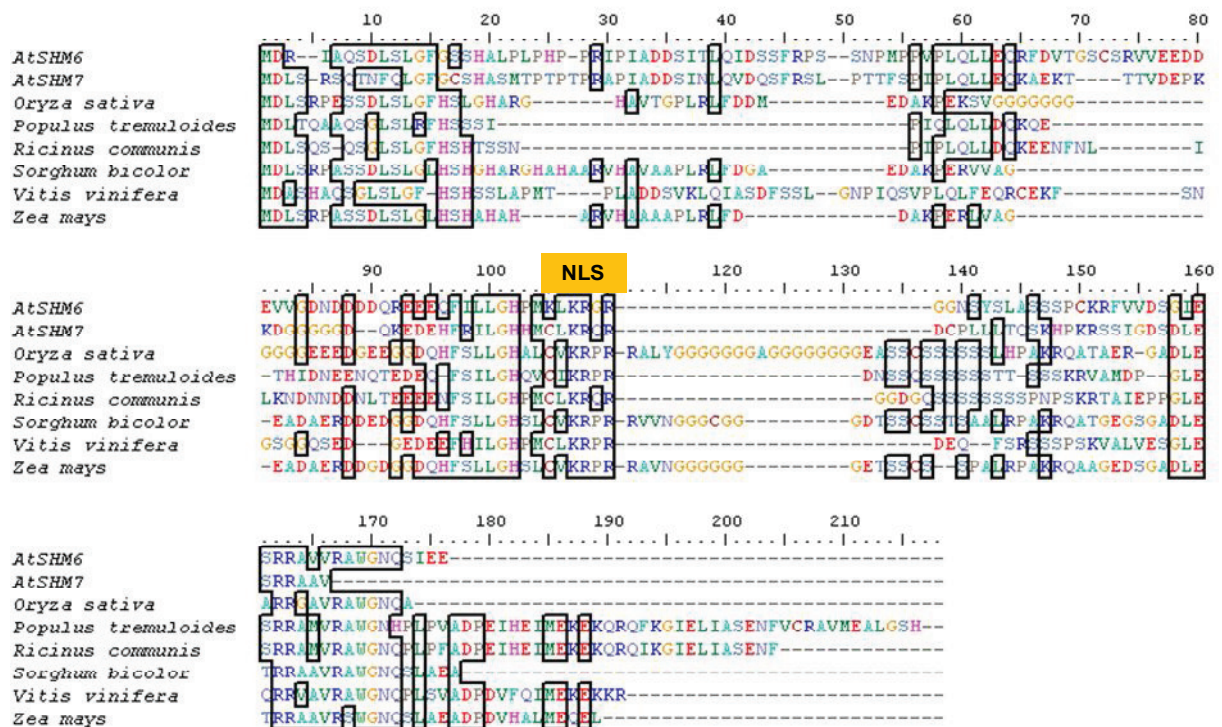


Abb. 14. Aminosäurealignment des N-Terminus verschiedener SHMT. Im einem 140 Aminosäuren langen Sequenzbereich wechseln Regionen mit struktureller Ähnlichkeiten und solchen großer Divergenz ab. Die Mehrzahl der abgebildeten Sequenzen beinhaltet eine monopartite NLS (Position der orangenen Box), was zumindest für diese eine Funktion dieses Sequenzbereiches eröffnet. Generiert mit ClustalX1.8. Sequenzen der Proteine in Tabelle 11.

3.2. Nachweis der subzellulären Lokalisation von SHMT6 und SHMT7

Das Reporterogen GFP kann direkt in lebenden Zellen visualisiert werden und benötigt keine Substrate oder Cofaktoren (Chalfie et al. 1994, Haseloff et al. 1997, Heim et al. 1994). Angeregt mit Licht aus dem blauen und ultravioletten Bereich des Wellenlängenspektrums fluoresziert es zwischen 500 nm und 520 nm. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Wahl dieses Markerproteins ist die Tatsache, dass es auch als Fusionsprotein seine fluoreszierenden Eigenschaften beibehält. Dies macht das GFP zu einem wichtigen Werkzeug bei Untersuchungen zur Proteinlokalisierung.

Mit Hilfe von GFP wurden Versuche unternommen die Lokalisation von SHMT6 und SHMT7 in Zellen von Arabidopsis nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden die cDNA-Sequenzen beider Gene, *SHM6* und *SHM7*, in pCambia1302 translational mit GFP fusioniert (Abb. 15A; Tabelle 17; 7.3.). Über Agrobakterien vermittelte Transformation wurden beide Konstrukte stabil in das Genom von Arabidopsis

integriert (2.3.4). Die *in planta* Expression der Konstrukte wurde durch den CaMV 35S-Promotor angetrieben, so dass keine Gewebespezifität zu erwarten war. Für jedes Konstrukt wurden mindestens 5 unabhängige transgene Linien erzeugt, die alle durch PCR überprüft wurden (Abb. 15B). Auch die Transkripte sind in ausgewählten Linien durch RT-PCR nachweisbar (Abb. 15C). Der Vektor pCambia1302 stellt ein Kontrollkonstrukt dar, welches cytosolisches GFP exprimiert. Dieses wurde ebenfalls in Col-0 integriert.

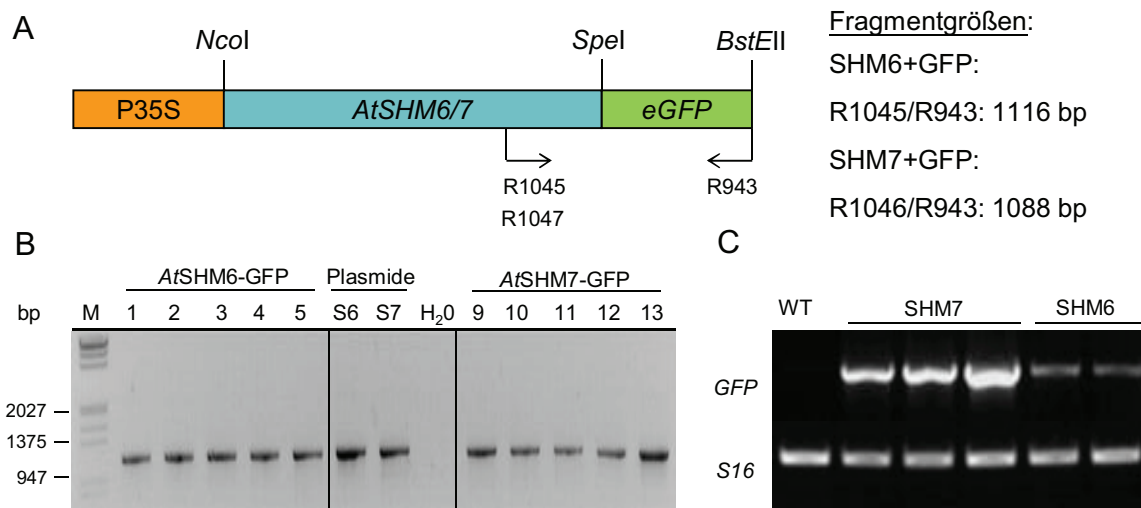


Abb. 15. Nachweis der Transgene (A) SHM6:GFP und SHM7:GFP in stabil transformierten Arabidopsis-Pflanzen mit gen- und GFP-spezifischen Primern. Das erwartete PCR-Fragment ist in je 5 unabhängigen Linien nachweisbar (B). Als Kontrollen dienten die rekombinanten Plasmide in den Spuren S6 und S7. (C) Das Transkript ist in cDNA-Präparaten mehrerer Linien nachweisbar (C). M, DNA EcoRI/HindIII-Größenstandard

3.2.1. Mikroskopische Untersuchungen transgener Pflanzen

Für Untersuchungen der GFP-Fluoreszenz mit dem Standardfluoreszenzmikroskop Olympus BX41 (2.8) eigneten sich Wurzeln junger Keimlinge. Diese enthalten keine Chloroplasten, deren Chlorophyll ein starkes fluoreszierendes Hintergrundsignal gibt.

Die Wurzeln junger Pflanzen wurden mit einem Skalpell abgetrennt und auf einem Objektträger mit Wasser platziert. Transgene Pflanzen, die das Konstrukt 35S:GFP trugen, exprimierten ein GFP, welches vorrangig im Cytosol zu finden war. Die grüne Fluoreszenz verteilte sich diffus in den Zellen der Wurzeln (Abb. 16B und C). In den untersuchten Linien mit den Konstrukten 35S:SHM6:GFP und 35S:SHM7:GFP war cytosolisches GFP nicht zu detektieren. Die grüne Fluoreszenz in diesen Pflanzen

entstammte einer anderen zellulären Struktur. Den Zellproportionen nach zu urteilen, handelte es sich hierbei um Zellkerne (Abb. 16D bis I). Zum Vergleich ist eine Wurzel einer wildtypischen nicht-transgenen Pflanze dargestellt (Abb. 16A).

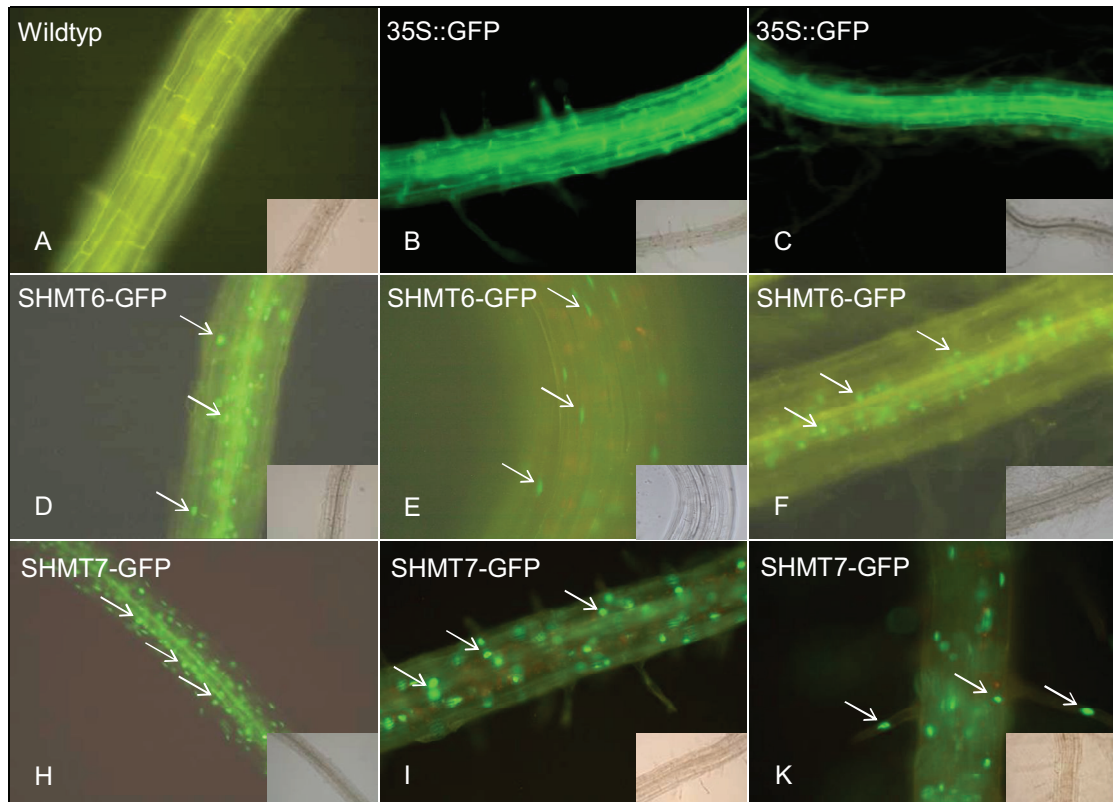


Abb. 16. GFP-Nachweise in Wurzelpräparaten. GFP ist unter dem Fluoreszenzmikroskop (2.8.1.) in den transgenen Pflanzen nachweisbar (B-K). Für SHMT6 und SHMT7 sind Zellkerne die vermuteten Orte der Lokalisation (Pfeile). Cytosolisches GFP liefert Fluoreszenz, die sich diffus über die gesamte Wurzel verteilt. Die eingebetteten Bilder sind Hellfeldaufnahmen und entsprechen den jeweiligen Fluoreszenzaufnahmen (große Bilder). Jede Aufnahme entstammt einer individuellen Linie. Vergrößerungen 200fach (A, B, C, D, H) bzw. 400fach (E, F, I, K).

Konfokale Lasermikroskopie zum Nachweis der Zellkernlokalisation

Um den Befund abzusichern, dass es sich bei den entsprechenden Strukturen tatsächlich um Zellkerne handelte, wurde konfokale Mikroskopie angewendet und chromosomale DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33242 angefärbt. Damit wurden Zellkerne als blau fluoreszierende Strukturen sichtbar. Von jungen Pflanzen jeweils 3 transgener Linien mit den Konstrukten 35S:SHM6:GFP und 35S:SHM7:GFP wurden Protoplasten aus Blattgewebe präpariert (2.3.11). Nach Färbung mit Hoechst wurden diese mit dem Konfokalmikroskop (2.8.1) untersucht.

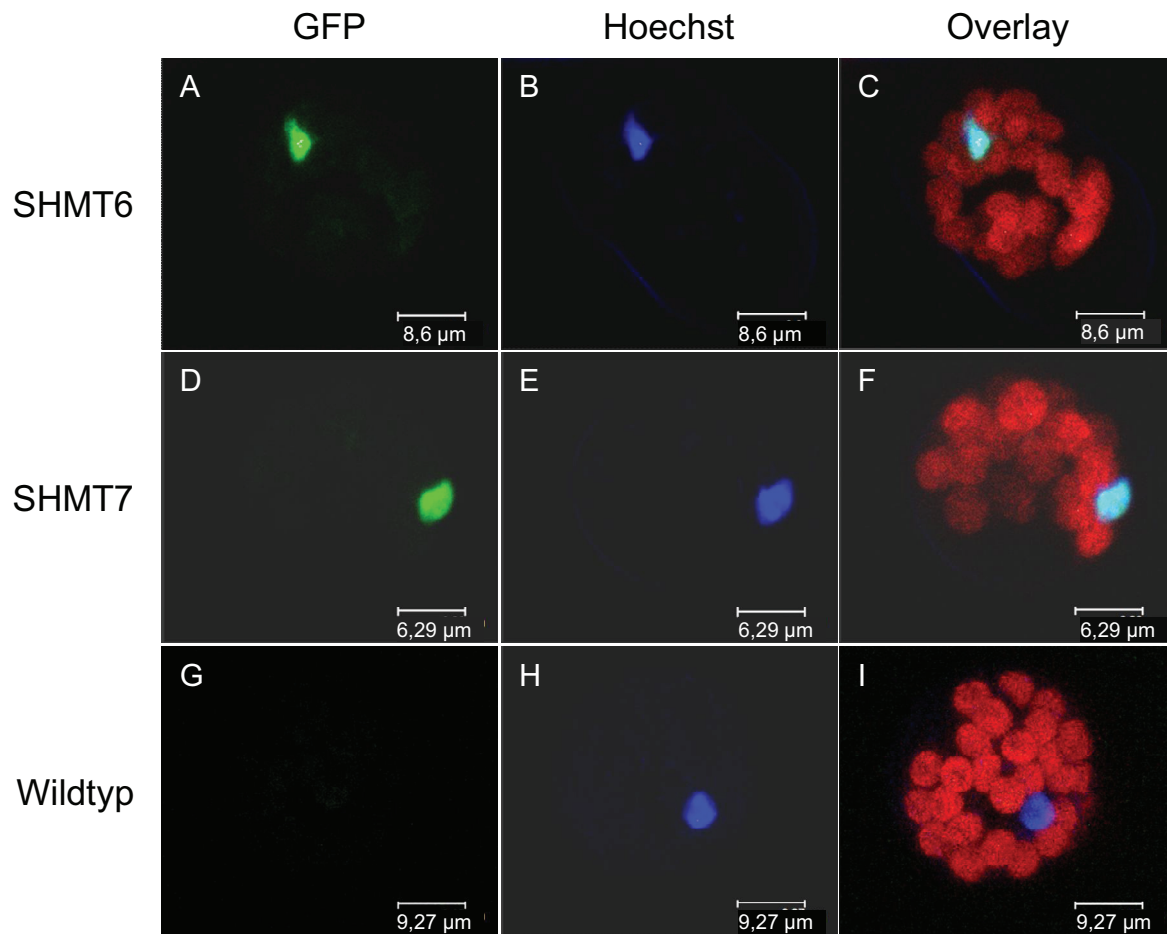


Abb. 17. Mikroskopische Analysen der subzellulären Lokalisation von SHMT6 und SHMT7. Aufnahmen von Protoplasten mit konfokaler Lasermikroskopie. GFP wurde in den transgenen Linien 35:SHM6:GFP und 35S:SHM7:GFP detektiert (A), (D). Hoechst bindet an doppelsträngige DNA und dient der Visualisierung von Zellkernen (B), (E), (H). Rote Fluoreszenz durch Chloroplasten zeigt die zelluläre Dimension des Protoplasten. Der Overlay vereint GFP, Hoechst und chloroplastidäre Fluoreszenz (C), (F), (I). Die Überlagerung von GFP und Hoechst zeigt die Kernlokalisierung von SHMT6 und SHMT7.

GFP-, Hoechst- und chloroplastidäre Fluoreszenz wurden separat visualisiert und anschließend durch Überlagerung vereint. Unter der Annahme, dass SHM6 und SHM7 im Zellkern lokalisiert sind, sollte blaue und grüne Fluoreszenz denselben Strukturen entstammen und sich überlagern. Das Chlorophyll fluoresziert im roten Wellenlängenbereich und diente der Darstellung der Protoplasten. Abbildung Abb. 17 zeigt das Ergebnis der Untersuchungen. Die Fluoreszenzsignale von GFP und Hoechst können durch Überlagerung derselben Struktur zugeordnet werden. Da Hoechst spezifisch chromosomale DNA färbt, müssen SHMT6 und SHMT7 im Zellkern lokalisiert sein.

3.3. Entwicklungsabhängige und gewebespezifische Expression von SHM6 und SHM7

Daten der Analysesoftware Genevestigator (www.genevestigator.com) zeigen ein voneinander abweichende Expressionsmuster der Gene *SHM6* und *SHM7* in Arabidopsis (Abb. 18). Die verfügbaren Microarray-Daten belegen für *SHM7* einen Anstieg der Transkriptmenge bis zum Rosettenstadium. Bis zum Beginn der Ausbildung der Infloreszenzen sinkt diese, um dann wieder mit Einsetzen der Schotenbildung anzusteigen. Damit wird offenbar während der frühen Entwicklungsphase und während der Zeit der Schoten- und Samenbildung mehr SHMT7-Protein benötigt. Für *SHM6* ergeben sich nur geringfügige Unterschiede. Die Transkriptmengen verbleiben während des Vegetationszyklusses auf niedrigem Niveau. Mit dem Reifungsprozess der Samen steigt die Expression auf ihren Maximalwert.

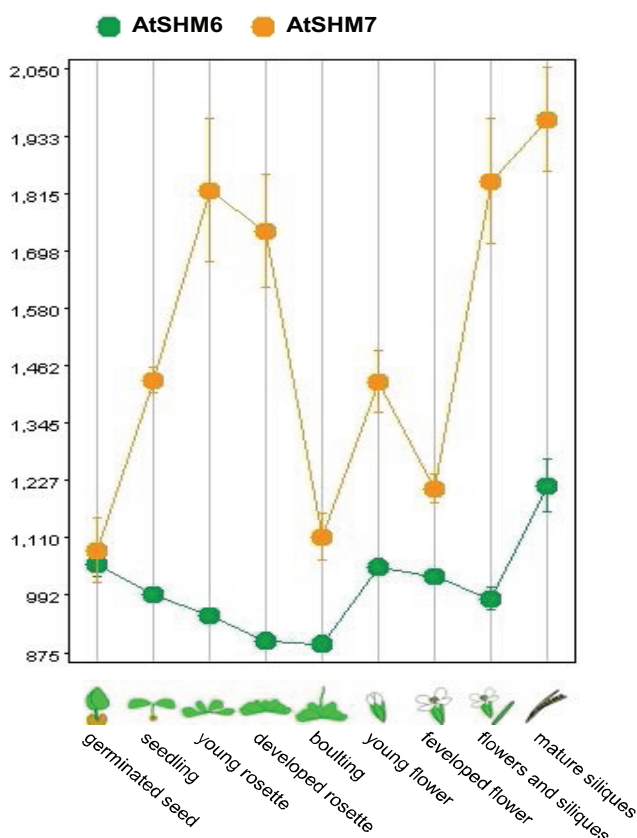


Abb. 18. Expressionsprofil von *AtSHM6* und *AtSHM7* anhand von Microarray-Daten. Die Kurve zeigt relative Transkriptmengen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von Col-0 Wildtyppflanzen.

Untersuchungen zur Genexpression von *AtSHM6* und *AtSHM7* mit RT-PCR zeigten die Anwesenheit der Transkripte beider Gene in den wichtigsten Geweben von Arabidopsis. Sie werden demnach in Wurzeln, Blüten und grünen Pflanzenorganen exprimiert (Abb. 19). Für die semiquantitative Analyse wurde aus den verschiedenen Organen einer Col-0 Pflanze im Blütenstadium mRNA isoliert und für RT-PCR (2.4.4) eingesetzt. Mit genspezifischen Primern wurden die Abschnitte der kodierenden Sequenzen der jeweiligen Gene amplifiziert. Anschließend erfolgte der Transfer der PCR-Produkte auf Nitrozellulosemembranen. Mit DIG-markierten SHM-spezifischen DNA-Sonden wurde die DNA hybridisiert und mit NBT/ZIB gefärbt (siehe 2.4.9.). Das Ergebnis repräsentiert den Ist-Zustand einer blühenden Arabidopsis-Pflanze.

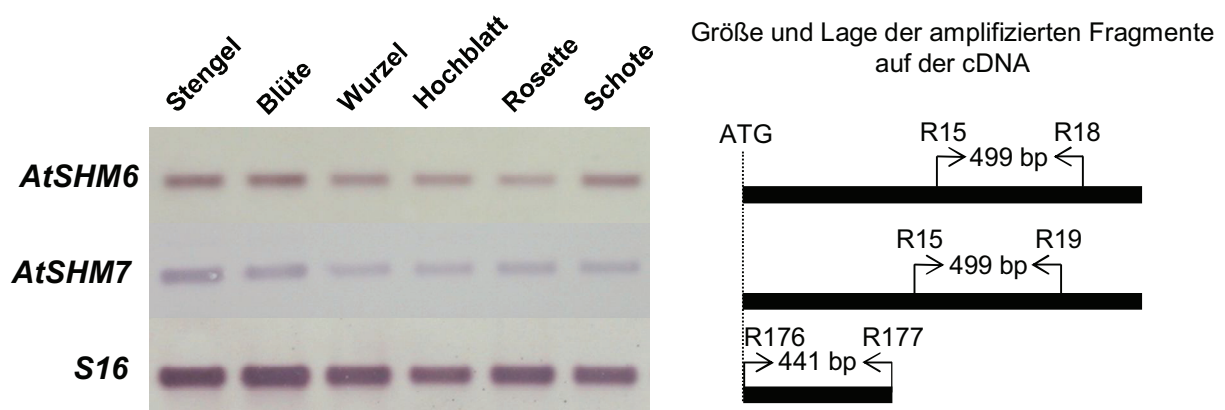


Abb. 19. Organspezifische Expression von *AtSHM6* und *AtSHM7*. RT-PCR und Southernhybridisierung mit SHM-spezifischen Sonden. NBT/ZIB-Färbung macht die markierte DNA sichtbar. *S16* ribosomale DNA diente als Standard zum Abgleich der cDNA-Mengen. PCR mit 22 Zyklen. Rechts, Lage der verwendeten Primer und Größe der amplifizierten Fragmente.

Die RT-PCR Daten wurden durch Untersuchungen der Promotoraktivität anhand transgener Arabidopsis Col-O im Wesentlichen bestätigt. Dazu wurden die Promotorbereiche, einschließlich 5'UTR, der Gene *AtSHM6* und *AtSHM7* nach PCR-Klonierung mit dem *uidA*-Gen für die β -Glucuronidase (GUS) fusioniert (Tabelle 17; Abb. 20A). Die stabile Transformation der Konstrukte in Col-0 erfolgte mit Hilfe von Agrobakterien. Das Screening nach transgenen Pflanzen brachte für jedes Konstrukt mindestens 5 unabhängige Linien. Der PCR-Nachweis bestätigt das insertierte Konstrukt in diesen Linien (Abb. 20B).

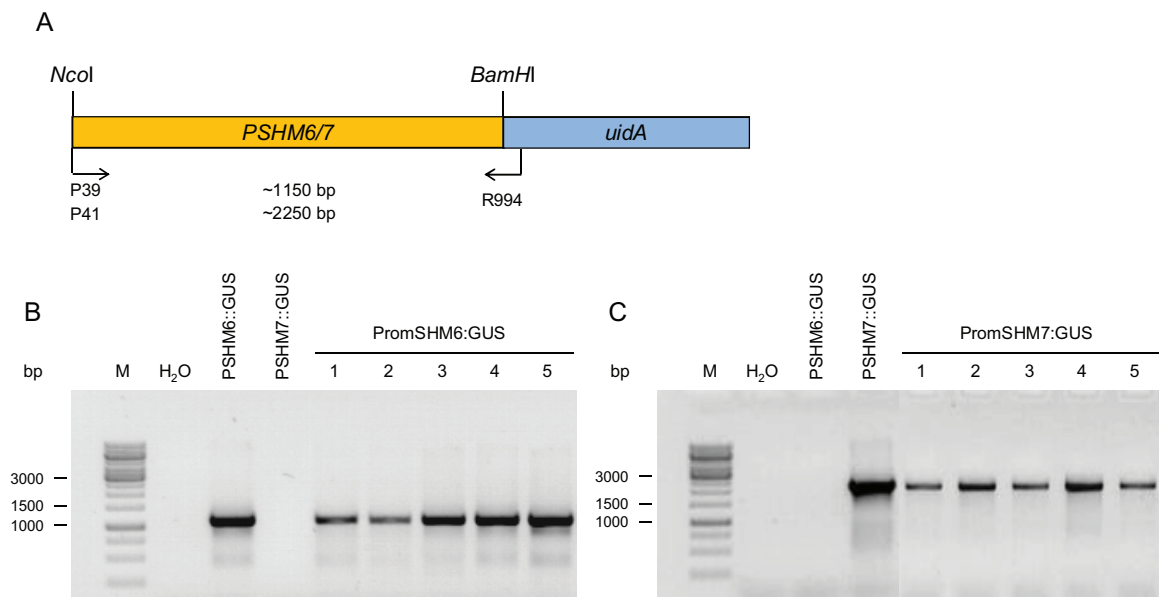


Abb. 20. Nachweis der Konstrukte PSHM6::GUS und PSHM7::GUS (A) in transgenen Arabidopsis-Pflanzen nach PCR. In mindestens 5 unabhängigen Linien konnte das entsprechende PCR-Produkt nachgewiesen werden (B, C). M, DNA Größenstandard 1 kb ladder.

Für die Untersuchung der Promotoraktivitäten wurden Pflanzen von je 3 Linien angezogen und in zeitlichen Abständen Blatt-, Wurzel- und Blütenorgane entnommen und mit GUS-gefärbt (2.3.12). Die Anzucht von Keimlingen erfolgte auf $\frac{1}{2}$ MS Agar. Pflanzen im 2-, 4-, 6- und 8-Blattstadium wurden dem GUS-Assay unterzogen. Im Ergebnis gab es in diesen Stadien keine Unterschiede in der Intensität und Verteilung der GUS-Färbung, so dass das Ergebnis in Abb. 21 als repräsentativ angesehen werden kann.

Die Promotoren beider Gene, *SHM6* und *SHM7* waren in allen Organen einschließlich Wurzeln, Blüten und Rosettenblätter aktiv (Abb. 21). Die dargestellten Organe entstammten einer blühenden Pflanze und hatten einen vergleichbaren Entwicklungsstand. Ähnliches gilt für junge Keimlinge. Auch in diesen wurde GUS konstitutiv exprimiert. Die Promotoren waren zu allen untersuchten Zeitpunkten in allen Organen aktiv. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die Expression der Gene *SHM6* und *SHM7* nicht an spezifische Zelltypen gebunden ist. GUS-Aktivität ist in allen Zellen vorhanden. Als Kontrolle für die Untersuchungen diente ein konstitutiv exprimiertes 35S::GUS Konstrukt.

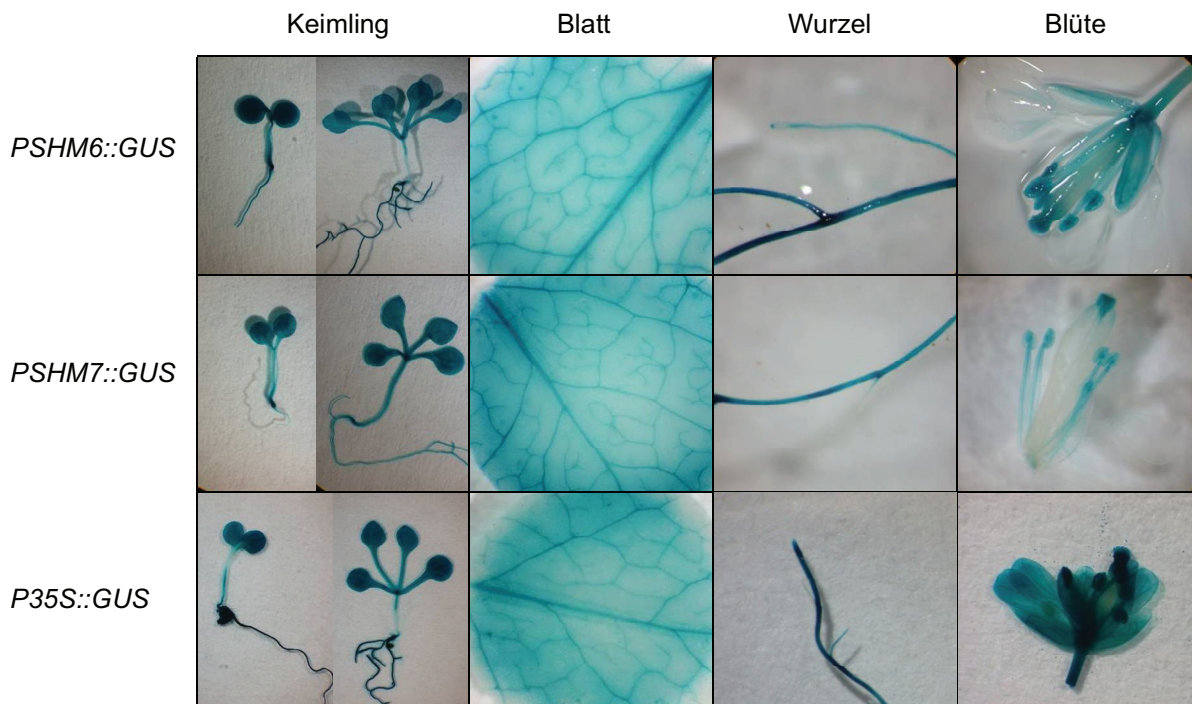


Abb. 21. Nachweis der gewebespezifischen *SHM6* und *SHM7* Expression durch Promotor:GUS Fusionsexperimente in *Arabidopsis*. Aufnahmen junger Keimlinge, sowie einzelner Organe einer adulten Pflanze im Blütenstadium. Die Expression von GUS wird durch die endogenen Promotoren von *AtSHM6* und *AtSHM7*, sowie konstitutiv durch CaMV 35S angetrieben.

3.4. Versuche zur Bestimmung der Enzymaktivität von SHMT6 und SHMT7 in-vitro

Serin-Hydroxymethyltransferasen (SHMT) setzen bevorzugt Serin nach Glycin um (siehe Abb. 1). Der im Verlauf der Reaktion gebildete Formaldehyd wird auf Tetrahydrofolat übertragen und es entsteht Methylen-Tetrahydrofolat. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die enzymatische Aktivität von SHMT6 und SHMT7 nach diesem Reaktionsprinzip nachzuweisen. Ein von Taylor und Weissbach (Taylor and Weissbach 1965) entwickelter Enzymtest mit $^{314}\text{-C}$ markiertem Serin als Substrat, fand bereits vielfach Anwendung (Besson et al. 1993a, Mitchell et al. 1986, Neuburger et al. 1996, Ramesh and Rao 1980).

3.4.1. Expression und Reinigung rekombinanter SHMT

Für den Enzymtest mussten rekombinante Proteine erzeugt und aufgereinigt werden. Dazu wurden die kodierenden Sequenzen der Gene *AtSHM6* und *AtSHM7*, sowie als Kontrollen der Gene *AtSHM1* und *AtSHM2* in den Überexpressionsvektor pHUE

kloniert (siehe Tabelle 17; 7.3.). Die pCal-n. Konstrukte wurden bereits zuvor durch Arbeiten der Abteilung erzeugt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die rekombinanten Proteine, die aus diesen Vektoren resultierten trugen tags für die Aufreinigung. Für pHUE war dies ein 11 kD N-terminaler His-Ubiquitin-tag (His-Ub) zur Reinigung an einer Ni-NTA-Matrix. Proteine aus pCal-n trugen C-terminal ein 4 kD Calmodulin-Bindeprotein zur Reinigung mit Calmodulin.

Tabelle 12. Theoretische Molmassen der verwendeten SHMT.

Protein	Molmasse (Mr) in Kilodalton (kD)		
	ohne tag	Mit His-tag	Mit CPB
SHMT1*	54	65	58
SHMT2*	56	67	60
SHMT6*	67	78	71
SHMT7*	66	77	70

*für Proteininformationen siehe Tabelle 1

Zunächst musste in einer Pilotexpression (2.6.1) untersucht werden, ob die Proteine in *E. coli* überexprimiert werden können. War dies der Fall wurden größere Bakterienkulturen angezogen und die Reinigung über die jeweilige Matrix durchgeführt.

Mit Ausnahme von pHUE-*AtSHM2* konnten alle anderen Konstrukte in *E. Coli* überexprimiert werden. Bei den anschließend durchgeführten Versuchen zur Reinigung der Proteine zeigte sich, dass mit pCal-n lösliches Protein für SHMT1 und SHMT2 hergestellt werden konnte, nicht aber für SHMT6 und SHMT7. Für beide letztgenannten Proteine gelang die Reinigung mit pHUE. Es wurde daher mit folgenden Konstrukten fort gefahren: pCal-n+*AtSHM1*, pCal-n+*AtSHM2*, pHUE+*AtSHM6* und pHUE+*AtSHM7*, sowie den entsprechenden Leervektoren.

Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der Klonierungen und der Pilotexpression für die Überexpression von SHMT1, SHMT2, SHMT6 und SHMT7. Eine Restriktion bestätigte die *SHM*-Fragmente in den Vektoren (Abb. 22A). Die dominanten Proteinbanden in den SDS-Gelen (Pfeile in Abb. 22B) deuten auf das rekombinante Protein hin, welches in den nicht induzierten Proben fehlt (ni). Die Leervektoren zeigen keine Proteinzunahme.

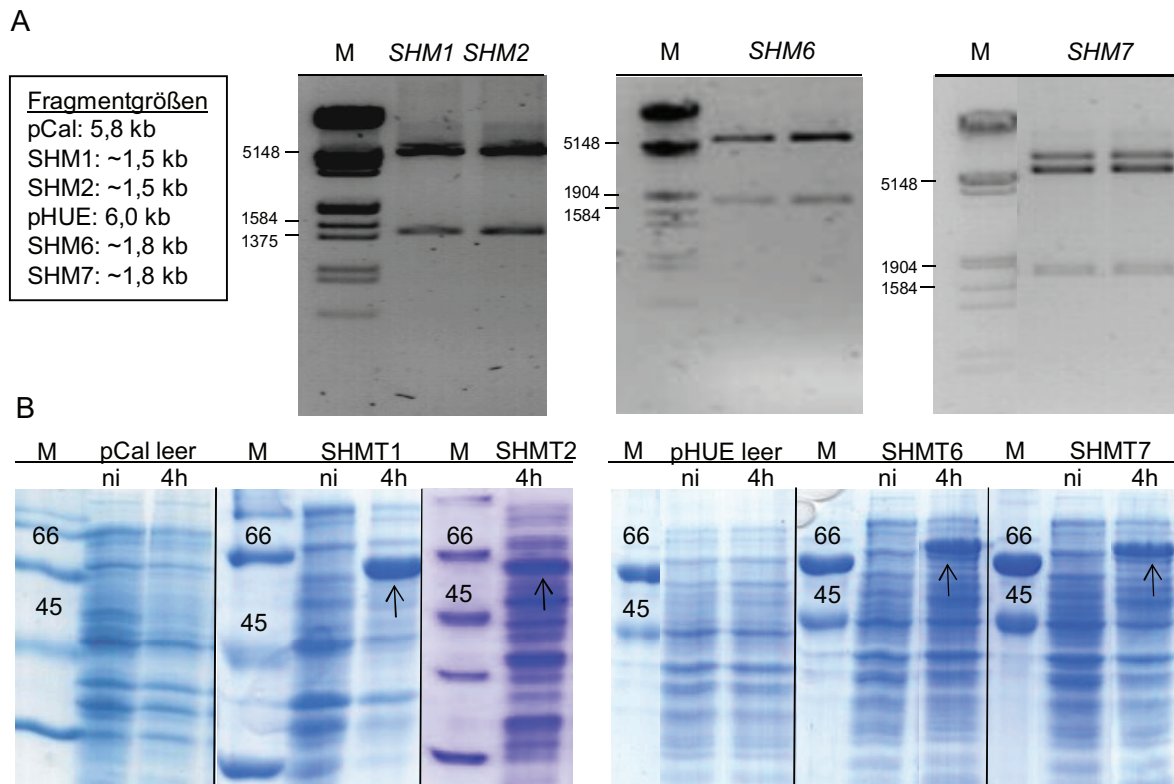


Abb. 22. Überprüfung der rekombinanten Vektoren durch Restriktion und Nachweis der Überexpression in *E. coli*. Die erwarteten Fragmentgrößen erscheinen im Agarosegel (A). M, DNA-Marker. Die Proteine SHMT1, SHMT2, SHMT6 und SHMT7 konnten mit dem entsprechenden Vektor überexprimiert werden (B). Induziertes Wachstum für 4 Stunden bei 37 °C. ni, nicht induziert. Die Leervektorkontrollen zeigen nach 4h keine zusätzlichen Proteinbanden. M-Marker, kD-Kilodalton

Die Reinigung von SHMT6 und SHMT7 erfolgte mit Ni-NTA-Agarose nach der, in 2.6.2., beschriebenen Prozedur. Durch Optimierung der Bedingungen konnte in den finalen Fraktionen eine Anreicherung rekombinanten Proteins erreicht werden (Abb. 23A durch Pfeil markiert). Schwächere Proteinbanden deuten auf Verunreinigungen mit Fremdprotein hin, welche nicht weiter reduziert werden konnten.

Um bei Bedarf den His-Ubiquitin-Anteil von den Fusionsproteinen zu entfernen, wurde mit dem gleichen Expressionssystem eine Ubiquitin-spezifische Protease Usp22_cc (Deubiquitylierungsenzym, DUB) aufgereinigt. Die finalen Fraktionen der Reinigung, die rekombinante Proteine enthielten, wurden für eine Stunde bei 37°C mit dieser Protease behandelt. Im SDS Gel wird dieser Abbau durch einen Größenunterschied der rekombinanten Proteine sichtbar. (Abb. 23B)

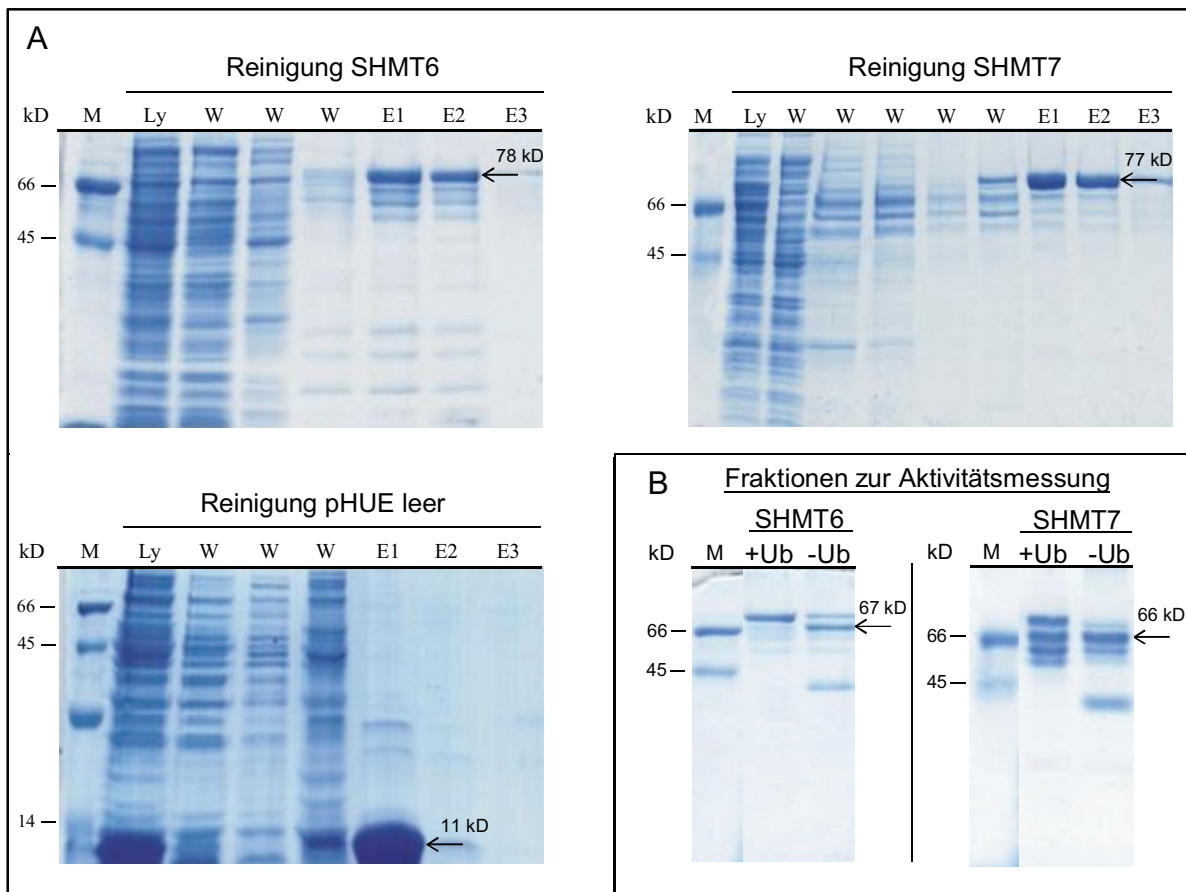


Abb. 23. Reinigung von SHMT6 und SHMT7 (A), sowie pHUE ohne Insert (A). Die Eluate 1 und 2 enthalten das meiste rekombinante Protein. Die dominierende Proteinbande hier (Pfeil) erscheint oberhalb der 66 kD Markerbande und enthält demnach das rekombinante His-tag-Fusionsprotein. Durch pHUE wird der ORF His-Ub exprimiert, so dass ein 11 kD Protein angereichert wird. Weitere dominierende Proteinbanden sind hier nicht erkennbar. Mit einem Deubiquitinylierungsenzym (DUB) wurden die N-terminalen Fusionstags von SHMT6 und SHMT7 entfernt. (B) zeigt Proteinfraktionen vor (+Ub) und nach (-Ub) Behandlung mit dem DUB. Ly-Lysat, W-Waschung, E-Eluat, M-Marker, kD-Kilodalton

SHMT1 und SHMT2 wurden über Calmodulin gereinigt. Auch hier wurden Proteine in den Eluaten angereichert. Die Fraktionen E2 enthielten dabei jeweils das meiste Protein. SHMT1 ist als 58 kD Fusionsprotein etwas kleiner als SHMT2 (60 kD). Dieser Größenunterschied scheint sich in der unterschiedlichen Lauflänge der jeweils dominierenden Proteinbande zu zeigen (Pfeil in Abb. 24). Kleinere Proteinbanden deuten auf Kontaminationen hin, die auch durch zusätzliche Waschschrte nicht vermindert werden konnten. Die jeweils stärkste Proteinbande entspricht der korrekten Größe der Proteine.

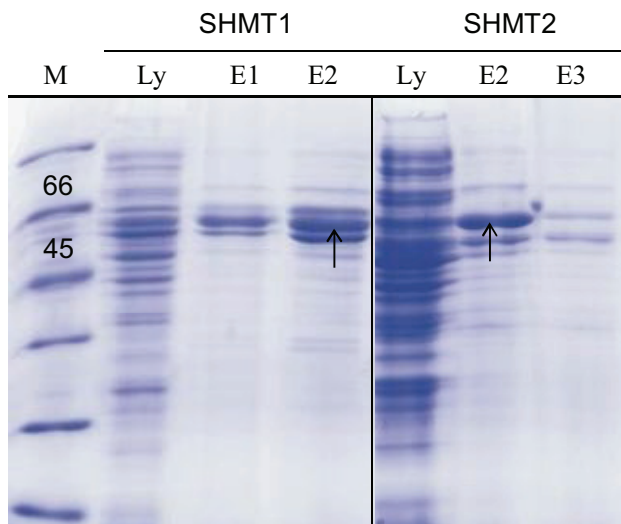


Abb. 24. Proteinfractionen nach affinitätschromatographischer Reinigung von SHMT1 und SHMT2. Die stärksten Proteinbanden treten im Eluat 2. E, Eluat. Ly. Lysat. M, Marker in kD.

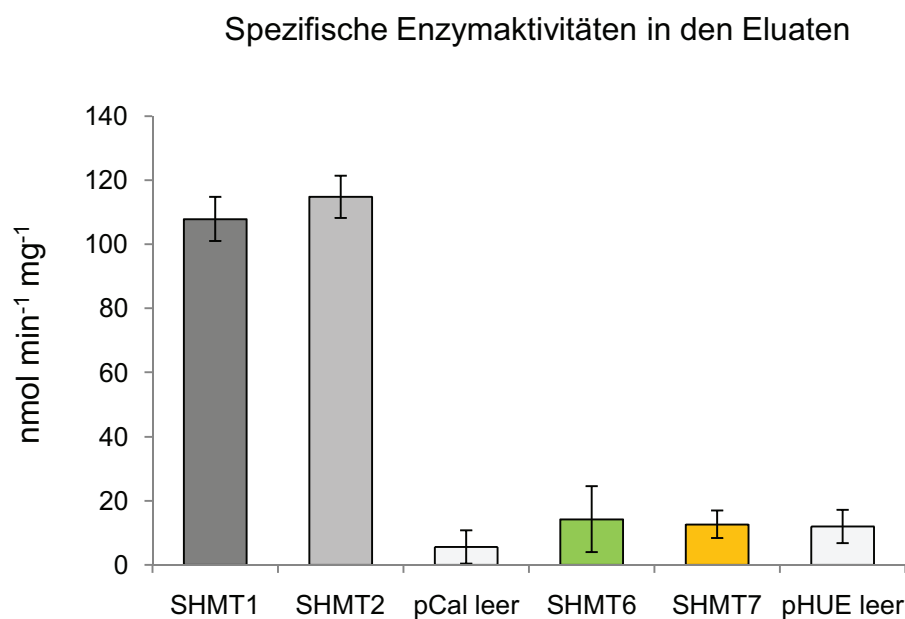


Abb. 25. Spezifische Enzymaktivitäten rekombinanter SHMT. SHMT1 und SHMT2 erreichen Aktivitäten um 110 mU/mg. Bei SHMT6 und SHMT7 war kein signifikanter Unterschied zum Leervektor messbar. Spezifische Enzymaktivitäten in mU/mg.

Die Aktivitätsmessungen wurden mit den Fraktionen des größten Proteinanteils in 4 Replikaten durchgeführt. Die erhaltenen Daten zeigen, dass SHMT1 und SHMT2 aktive Enzyme sind und Serin auf vergleichbarem Niveau von ~110 mU/mg (1 mU = 1 nmol min⁻¹) umsetzen (Abb. 25). Möglicherweise ist die spezifische Aktivität höher, da Kontaminationen durch Fremdproteine nicht zur Aktivität beitragen.

Die Proteine SHMT6 und SHMT7 waren unter diesen Bedingungen enzymatisch nicht aktiv. Ein Umsatz von Serin wurde nicht ermittelt. Die erhaltenen spezifischen Aktivitäten unterschieden sich nicht wesentlich von denen des Leervektors, welcher den Background der Versuchsreihe darstellt.

3.5. Isolierung homozygoter Arabidopsis-Pflanzen mit Defekt in *AtSHM6* und *AtSHM7*

Beide Proteine, SHMT6 und SHMT7, werden in Arabidopsis jeweils durch ein einzelnes Gen kodiert. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die kodierten Proteine auf die Physiologie von Arabidopsis haben, wurden T-DNA-Insertionslinien für die Gene *AtSHM6* (SALK_050632) und *AtSHM7* (SALK_118251) vom SALK-Institut La Jolla angefordert. Diese Linien trugen die Bezeichnung *shm6-1* und *shm7-2*. In beiden sollte durch die Mutation kein Genprodukt mehr gebildet werden können. In Abb. 26 ist die Lage der T-DNA in den Genen dargestellt. Für *AtSHM6* erfolgte die T-DNA-Insertion in Intron 2. Bei der Mutante *shm7-2* liegt die T-DNA im 1. Exon nahe dem Startkodon von *AtSHM7*. Durch Sequenzierung wurde der Ort der T-DNA-Insertion in beiden Allelen bestätigt.

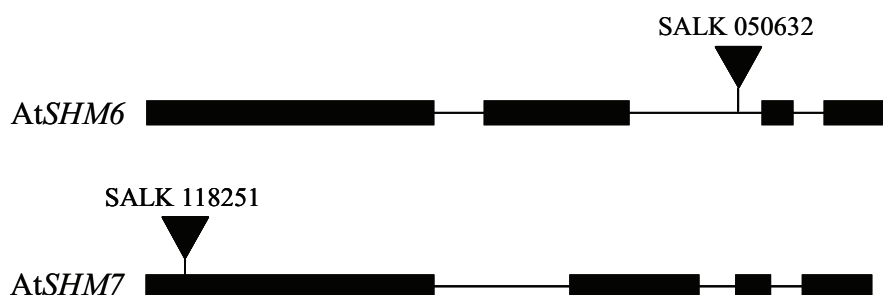


Abb. 26. Genstruktur von *AtSHM6* und *AtSHM7*. Schwarze Kästchen repräsentieren Exons, Linien Introns. Das Dreieck gibt Name und Position der T-DNA-Insertion an.

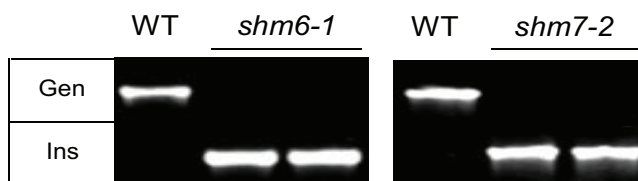
Nachweis der T-DNA und Bestimmung der Zygotie in den Linien *shm6-1* und *shm7-2*

Sämtliche T-DNA-Insertionslinien wurden als heterozygote Vertreter (T0-Generation) vom SALK-Institut bezogen. Nach Aussaat war in der nachfolgenden T1-Generation eine Aufspaltung der Genotypen und damit homozygote Pflanzen zu erwarten. Von jeder Linie, *shm6-1* und *shm7-2*, wurden etwa 20 Individuen angezogen und mittels PCR auf Vorhandensein der entsprechenden T-DNA-Insertion, sowie Zygotie

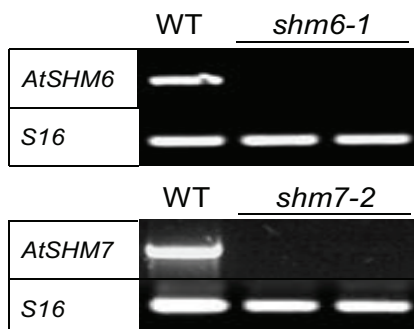
überprüft. Mindestens eine Pflanze für jede Linie konnte als homozygot identifiziert werden. Um den Befund abzusichern wurde auch die T2-Generation in gleicher Weise analysiert. Im Ergebnis konnte mit Gen- und T-DNA-spezifischen Primern (Abb. 27C), in einer PCR mit genomischer DNA als Matrize, in den Nachkommen jeder Linie die T-DNA nachgewiesen werden. Die PCR-Produkte hatten die im Voraus ermittelte Basenzahl von etwa 1250 bp für die Primerkombination P143/R175 (*shm6-1*) und ~1,9 kb für die Kombination R175/R19 (*shm7-2*). Weiterhin wurde gezeigt, dass die untersuchten Pflanzen homozygot für die jeweilige Mutation waren. Dies wurde mit genspezifischen Primern (P143/R264 bzw. R251/R19) ermittelt, welche auch den Ort der T-DNA-Insertion einschlossen (Abb. 27A).

Die gleichen Individuen jeder Linie wurden herangezogen, um den *knock-out* auf Transkriptebene zu untersuchen. Dazu wurde mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer anschließenden PCR konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Transkript (mit P142/P144 für SHM6 und P145/P148 für SHM7) nicht mehr vorhanden war (Abb. 27B). Es konnte nun davon ausgegangen werden, dass in der Pflanze kein funktionsfähiges Genprodukt für *AtSHM6* bzw. *AtSHM7* mehr gebildet wurde und es sich somit um einen vollständigen Funktionsverlust handelte.

A



B



C

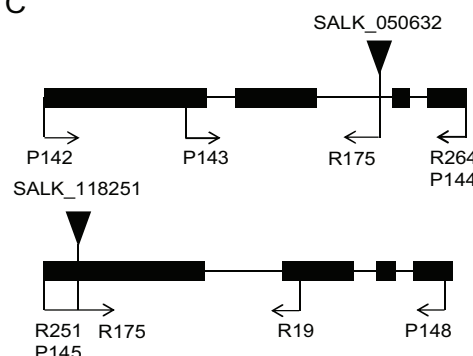


Abb. 27. Nachweis des Gendefekts im Genom der T-DNA-Mutanten *shm6-1* und *shm7-2* und auf Transkriptebene. (A) *shm6-1* und *shm7-2* sind homozygot bezüglich der T-DNA-Insertion (Ins). Im Bereich der T-DNA wurde kein genspezifisches PCR-Produkt gebildet (Gen). (B) RT-PCR mit genspezifischen Primern zum Nachweis des *knock-out* auf Transkriptebene. S16 ribosomale DNA als interner Standard. (C) Lage der Primer zum Nachweis der T-DNA-Insertion und Zygosität in *AtSHM6* bzw. *AtSHM7*.

Erzeugung einer Doppelmutante mit Defekt in SHM6 und SHM7

Durch Kreuzen von homozygoten Pflanzen der Linien *shm6-1* und *shm7-2* gelang es, eine Linie mit kombiniertem *knock-out* in *SHM6* und *SHM7* zu erzeugen. Diese erhielt analog den Elternlinien die Bezeichnung *shm6+7*. Auch diese Linie ist homozygot für die entsprechende T-DNA-Insertion und auch die Transkripte sind nicht mehr nachweisbar. Abbildung 28 zeigt für 3 Pflanzen der Linie *shm6+7* die PCR-Nachweise für die Homozygotie der T-DNA-Insertion (Abb. 28A) und des *knock-out* auf Transkriptebene (Abb. 28B).

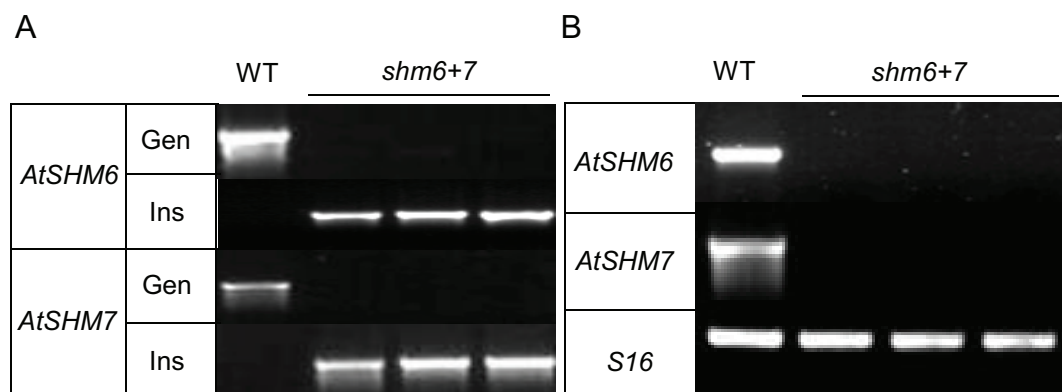


Abb. 28. Nachweis des knock-out in der Doppelmutante. Mit genspezifischen Primern wurde in der Linie *shm6+7* die T-DNA-Insertion beider Elternlinien (SALK_050632 und SALK_118251) nachgewiesen (A) (Gen, Ins). Diese resultieren in dem vollständigen Transkriptverlust für *AtSHM6* und *AtSHM7* (B). Primerkombinationen wie Einzelmutanten in Abb. 27.

3.6. Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien

Um zu untersuchen, inwieweit SHMT6 und SHMT7 einen Einfluss auf das Wachstum und andere physiologische Parameter ausüben, wurden Pflanzen jeder T-DNA-Linie, *shm6-1*, *shm7-2* und *shm6+7*, mit dem Wildtyp verglichen. Die phänotypische Charakterisierung umfasste dabei den gesamten Vegetationszyklus von Arabidopsis, wobei das Hauptaugenmerk zunächst auf das äußere Erscheinungsbild der Pflanzen gelegt wurde.

Verschiedene Wachstumsparameter, sowie stoffwechselphysiologische Analysen, so z.B. Metabolitbestimmungen, sollten weiterhin dazu beitragen, die Rolle der beiden Proteine für den Stoffwechsel von Arabidopsis aufzuklären. Da *AtSHM7* salzreguliert zu sein scheint, sollten zusätzlich unter Salzstress Hinweise auf die Funktion von

SHMT6 und SHMT7 gewonnen werden. Es ist möglich, dass durch Salzstress physiologische Effekte ausgelöst werden oder bestehende Effekte in ihrer Wirkung moduliert werden.

3.6.1. Wachstum im Keimlingsstadium

Es wurden zunächst Daten zum Keimungsverhalten und Wurzelwachstum von Mutantenlinien und Wildtyp unter Normalbedingungen und Salzstress gesammelt. Zur Durchführung siehe auch 2.3.6 und 2.3.7.

Keimung und Wurzelwachstum unter Normalbedingungen

Wie anhand der Kurve in Abb. 29B zu erkennen ist, ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Keimungsverhalten der Doppelmutante zu allen anderen Linien. Die Keimungsrate, das prozentuale Verhältnis der gekeimten zur Gesamtzahl der Samen, war für jeden der untersuchten Zeitpunkte geringer. Während für den Wildtyp und die Einzelmutanten bereits nach einem Tag mehr als Dreiviertel der Samen gekeimt waren, verzögerte sich die Keimung der Linie *shm6+7* um mehrere Tage. Die Mehrheit der Samen keimte hier erst nach 3-5 Tagen. Eine Keimungsrate von 96-99 %, wie in den anderen Linien, erreichte die Doppelmutante nicht. Das bedeutet, dass ein gewisser Prozentsatz der Samen nicht mehr keimfähig war. Der Maximalwert gekeimter Samen war für *shm6-1*, *shm7-2* und Wildtyp nach 7 Tagen erreicht. Für *shm6+7* setzte sich die Keimung einzelner Samen bis zu 14 Tage fort (Tabelle 13).

Tabelle 13. Keimungsraten nach 7 und 14 Tagen auf MS-Agar. Wildtyp, *shm6-1* und *shm7-2* erreichen Werte zwischen 96-99%.

Linie	Keimungsrate	
	Tag7	Tag14
Wildtyp	96,5 %	96,5 %
<i>shm6-1</i>	98,8 %	98,8 %
<i>shm7-2</i>	99,6 %	99,6 %
<i>shm6+7</i>	81,4 %	84,6 %

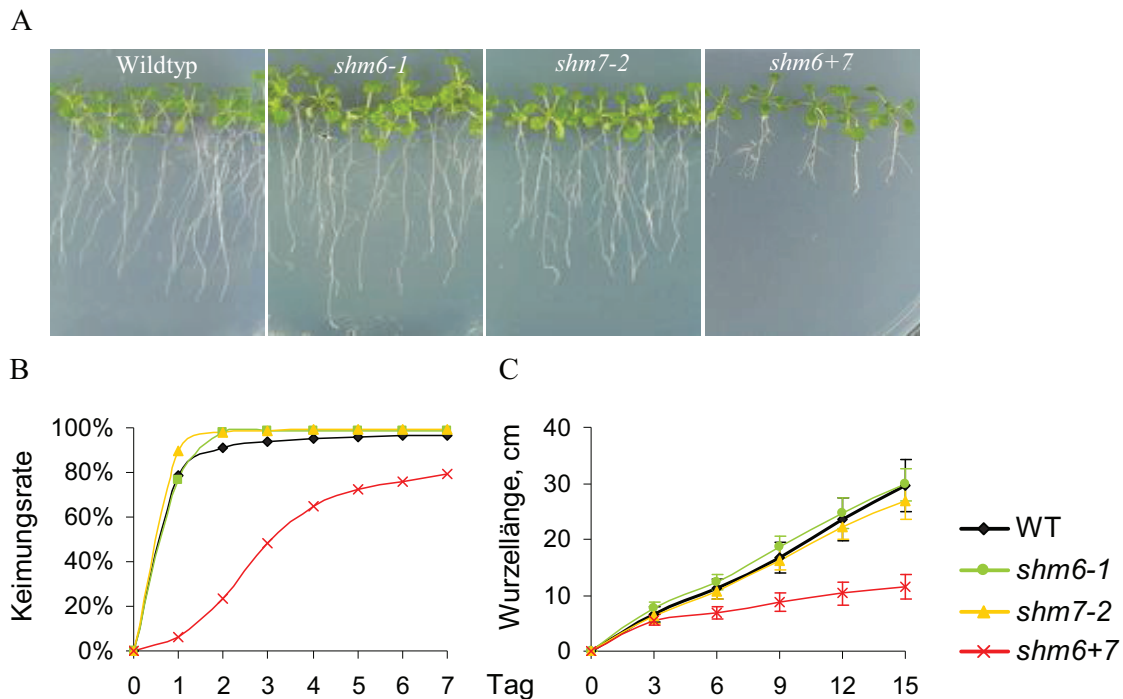


Abb. 29. Keimung und Wachstum auf MS-Agar. A, Vergleich der Wurzellängen nach 21 Tagen Wachstum. B, Keimungsraten in % über einen Zeitraum von 7 Tagen. C, mittlere Wurzellängen der untersuchten Linien zu festgelegten Zeitpunkten.

Die Messung der Wurzellängen erfolgte für jedes Individuum im gleichen Abstand von 3 Tagen nach Keimung. Dazu musste zu jedem Samen der Zeitpunkt der Keimung dokumentiert werden. Die Doppelmutante zeigte eine deutliche Wachstumsverlangsamung gegenüber dem Wildtyp, während die Einzelmутanten keinen Unterschied erkennen ließen (Abb. 29C). Pflanzen der Linie *shm6+7* hatten zu jedem Zeitpunkt kürzere Wurzeln, wobei der Unterschied mit zunehmender Zeit signifikanter wurde. Am letzten Messpunkt lag die durchschnittliche Wurzellänge der Doppelmutante noch bei etwa rund einem Drittel der anderen Linien.

Das Sprosswachstum schien weniger beeinflusst. Deutliche Unterschiede waren nicht erkennbar. Die 3 Wochen alten Pflanzen in Abb. 29A waren zu diesem Zeitpunkt annähernd gleich entwickelt.

Keimung und Wurzelwachstum unter Salzstress

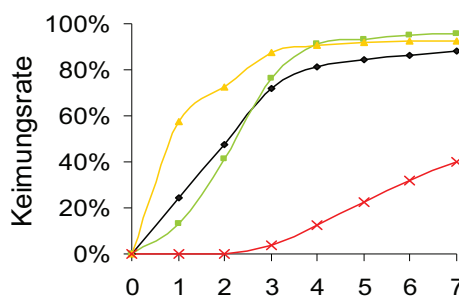
Salzstress wurde mit 100 mM NaCl im Medium induziert. Unter diesen Bedingungen kommt es in den untersuchten Linien ebenfalls zu deutlichen Unterschieden im Keimungsverhalten (Abb. 30B). Etwa die Hälfte der Samen der Linie *shm7-2* war nach den ersten 24 Stunden gekeimt. Nach 72 Stunden bildeten mehr als 90 % aller

keimfähigen Samen die Primärwurzel. Im Wildtyp und der *shm6-1* Mutante sind nur 10-20% aller Samen nach dem ersten Tag und die Hälfte nach Tag 2 gekeimt. Nach 4 Tagen nähern sich diese beiden Linien der *shm7-2* an. Für die Doppelmutante ergibt sich folgendes Bild. Erst nach 72 Stunden unter der Lichtbank, waren die ersten Samen gekeimt. Die Keimung setzte sich fort, bis nach 7 Tagen etwa 40 % und nach 14 Tagen ~55 % der Samen gekeimt waren (Tabelle 14). Salzstress führt also zu einer Abnahme der Keimfähigkeit um etwa die Hälfte. Dieser Trend konnte in den anderen 3 Linien nicht festgestellt werden.

A



B



C

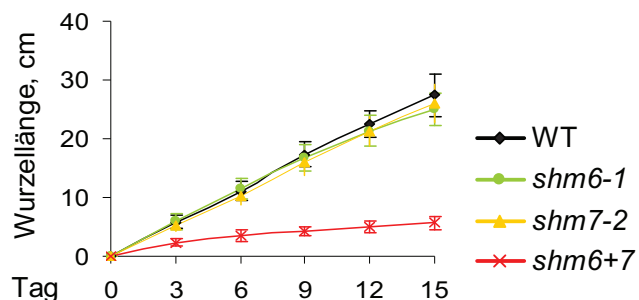


Abb. 30. Keimung und Wachstum auf MS Agar+100 mM NaCl. Aussehen der Pflanzen jeder Linie nach 21 Tagen Wachstum (A). Keimungsrate (B) und Wurzelwachstum (C) lassen deutlich Unterschiede zur Doppelmutante *shm6+7* erkennen.

Im Wurzelwachstum unterschieden sich die T-DNA-Einzelmutanten und der Wildtyp nicht wesentlich. Wie die Wachstumskurve verdeutlicht, sind die Wurzellängen dieser 3 Linien annähernd auf gleichem Niveau (Abb. 30A und C). Die Doppelmutante dagegen weist deutlich kürzere Wurzeln auf. Am Ende des Untersuchungszeitraumes hatten diese Wurzeln nur noch ein Fünftel der Länge der anderen Linien.

Tabelle 14. Keimungsrate nach 7 und 14 Tagen auf MS-Agar mit 100 mM NaCl. Wildtyp, *shm6-1* und *shm7-2* erreichen Werte zwischen 90-96%.

Linie	Keimungsrate	
	Tag 7	Tag14
Wildtyp	90,2 %	90,2 %
<i>shm6-1</i>	96,1 %	96,1 %
<i>shm7-2</i>	93,7 %	93,7 %
<i>shm6+7</i>	38,8 %	54,9 %

Bestimmung der Aminosäuregehalte junger Keimlinge

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass ein kombinierter *knock-out* in *SHM6* und *SHM7* zu einer Verzögerung der Keimung und einem verkürzten Wurzelwachstum führt. Durch Bestimmung der Aminosäuregehalte dieser Pflanzen sollten Hinweise auf eine mögliche Ursache für dieses Phänomen gefunden werden. Die Keimlinge aus 3 Agarplatten wurden zu Proben mit mindestens 50 mg Frischmasse vereint und aufgearbeitet (2.3.9). Die Bestimmung der Aminosäuregehalte erfolgte mit einer HPLC. Die Daten jeder Linie wurden mit dem Wildtyp verglichen und ein Student'scher T-Test durchgeführt, um die statistische Signifikanz zu ermitteln.

Unter Normalbedingungen kommt es bereits zu signifikanten Veränderungen in den T-DNA Linien bei den Aminosäuren Histidin, Isoleucin und Methionin, sowie allen 3 aromatischen Aminosäuren (Abb. 31). Diese Änderungen betreffen hauptsächlich die *shm6+7* Doppelmutante und zeigen mit Ausnahme von Methionin einen Anstieg gegenüber dem Wildtyp. Für *shm6-1* konnte lediglich bei Isoleucin eine Veränderung registriert werden. Hier gibt es gegenüber dem Wildtyp eine Reduzierung. Tryptophan und Tyrosin sind dagegen die einzigen Aminosäuren der *shm7-2* Mutante die verändert sind; mit Werten über Wildtypniveau.

Unter Salzstress kommen weitere Aminosäuren hinzu, deren Konzentration in den T-DNA Linien, in Bezug auf den Wildtyp, verändert sind. Dies sind Glutamin, Leucin, Threonin und Valin. In der Doppelmutante liegen diese vier Aminosäuren über Wildtypniveau. Bei der *shm7-2* Mutante ist es Glutamin mit einem höheren und Threonin mit einem geringeren Wert. Für *shm6-1* ergeben sich keine Änderungen.

Alle anderen Aminosäuren sind sowohl unter Normalbedingungen als auch unter Salzstress statistisch unverändert. Vergleicht man die Veränderungen der Aminosäuregehalte, die durch den Salzstress hervorgerufen werden, so wird deutlich, dass die Pflanzen der Doppelmutante besonders häufig mit einem Anstieg bei den Aminosäuren reagieren. Bei Aspartat, Leucin, Valin, Phenylalanin und Tryptophan ist dies der Fall. Serin und Threonin dagegen sind in allen Linien deutlich erhöht.

Die Gehalte der SHM-Substrate Serin und Glycin befinden sich in allen untersuchten Linien sowohl unter Normalbedingungen, als auch unter Salzstress auf einem vergleichbaren Niveau oder sind zumindest vom Wildtyp nicht signifikant verschieden. Der *knock-out* der Gene *SHM6* und *SHM7* hat in diesem Entwicklungsstadium somit keinen Einfluss auf den Metabolismus dieser Aminosäuren. Durch Salzstress steigen die Konzentrationen von Serin stark an. Gleichzeitig sinken die Glycingehalte in drei Linien.

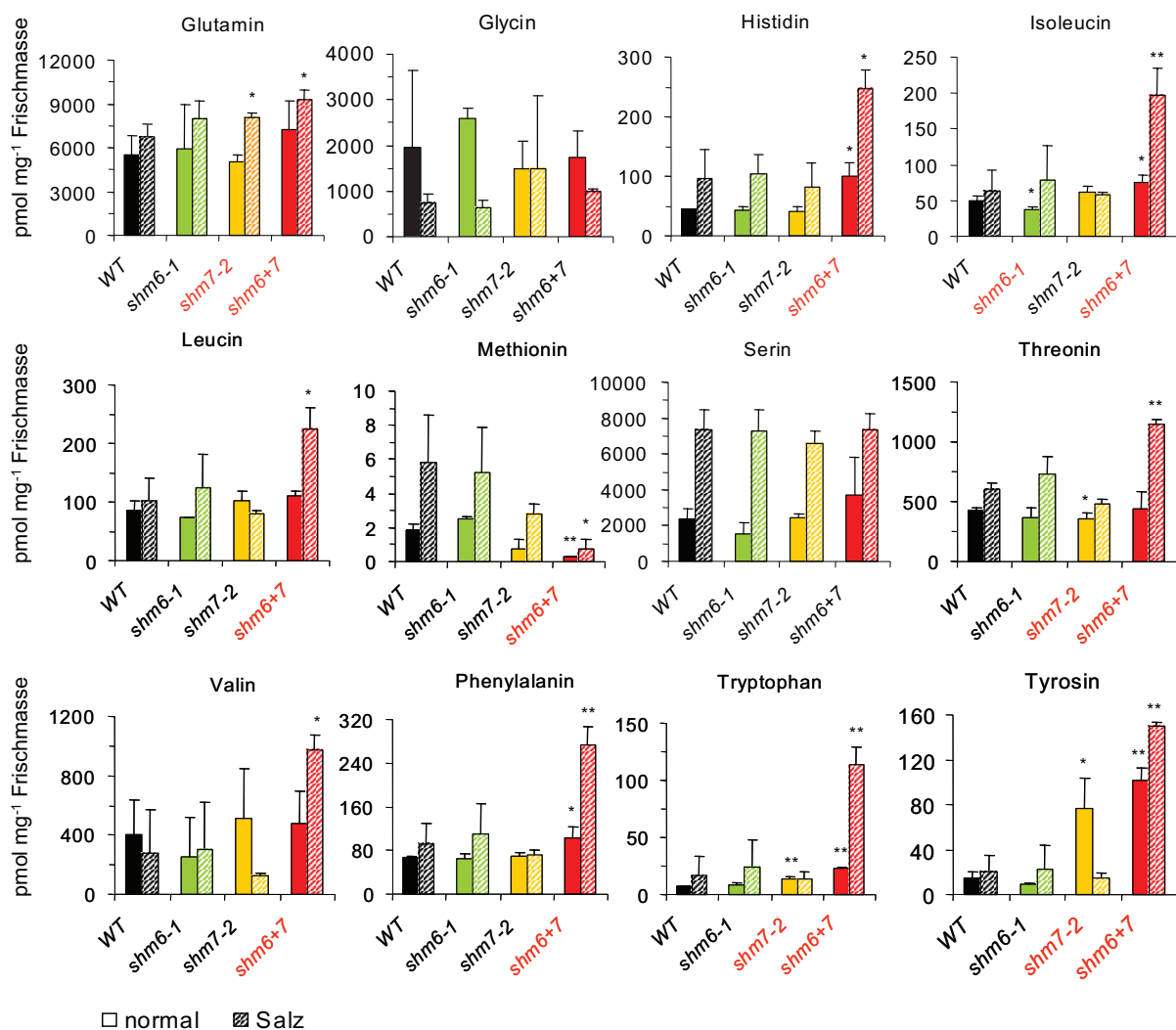


Abb. 31. Aminosäureanalyse durch HPLC. Rot markiert, T-DNA Linien mit signifikanten Konzentrationsunterschieden in der Aminosäure im Vergleich zum Wildtyp. Die SHM-Substrate Glycin und Serin zeigen keine Veränderungen zum Wildtyp. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ nach den Ttest. $MW \pm$ Standardabweichung ($n=3$).

3.6.2. Einfluss von Gibberellinsäure auf die Keimung

Gibberellinsäure ist ein wichtiges Pflanzenhormon, welches unter anderem die Keimung von Pflanzen beeinflusst. Es hebt die Wirkung der Abscisinsäure, dem wichtigsten Wachstumsinhibitor im Keimlingsstadium, auf. Es sollte getestet werden, ob möglicherweise ein hormonelles Ungleichgewicht die Ursache für die drastische Keimungsverzögerung ist. Die Samen von Wildtyp und *shm6+7* wurden auf Agar mit und ohne 100 mM NaCl, sowie mit und ohne 75 mM Gibberellinsäure platziert und die Keimung dokumentiert. Abweichend von 2.3.6 beschrieben wurden jeweils 3 Agarplatten mit je ~50 Samen belegt.

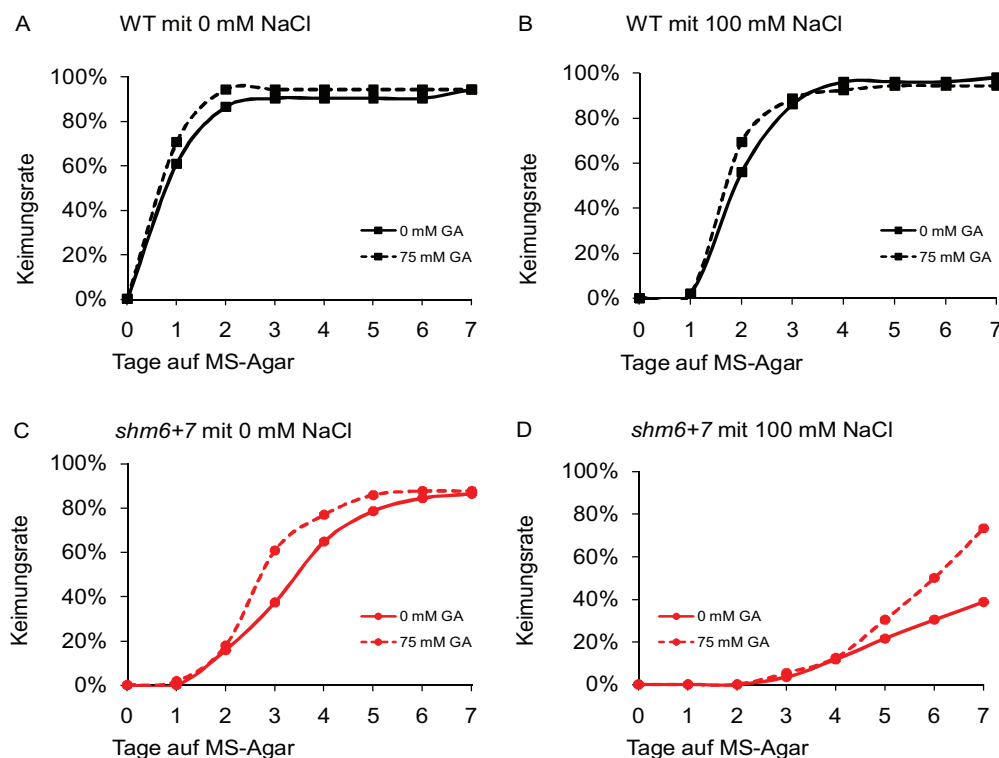


Abb. 32. Keimungsraten von Wildtyp und *shm6+7* auf Agar mit und ohne 100 mM NaCl, sowie in Gegenwart oder Abwesenheit 75 mM Gibberellinsäure (GA).

Gibberellinsäure hat auf die Keimung des Wildtyps nahezu keinen Einfluss. Auf salzfreiem und salzhaltigem Agar verlaufen die Kurven mit und ohne GA nahe

beieinander (Abb. 32A und B). Der Keimungsbeginn bleibt unverändert. Dagegen lässt sich bei der Doppelmutante eine leichte Verbesserung in beiden Fällen beobachten. Auf Agar ohne Salz kann nach 3 Tagen ein Anstieg der gekeimten Samen festgestellt werden, welcher über 2 Tage anhält, ehe sich die Kurven angleichen (Abb. 32C). Auf salzhaltigem Agar, der den drastischsten Effekt auf die Keimung hatte, wurde durch die Gabe von GA die Keimungsrate am Ende des dargestellten Zeitraumes fast verdoppelt (Abb. 32D). Den Keimungsbeginn konnte das Hormon auch für die Doppelmutante nicht verändern.

3.6.3. Wachstum bis zur reifen Pflanze

Um das Wachstum jeder Linie ausreichend zu dokumentieren wurden >20 Individuen jedes Genotyps randomisiert in einem CONVIRON Klimaschrank angezogen (2.3.8). Das Randomisierungsverfahren sollte Wachstumsunterschiede durch die Position einer Pflanze im Klimaschrank ausgleichen. Tatsächlich konnte auf diese Weise die Mehrheit der Pflanzen jeder Linie in einem für sie charakteristischen Erscheinungsbild erhalten werden. In jeder Linie gab es ein bis mehrere Pflanzen, die dem typischen Bild nicht entsprachen. Diese wurden für die nachfolgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt und aussortiert. Über einen Zeitraum von 18 Tagen wurden von typischen Vertretern jeder Linie Fotoaufnahmen angefertigt.

Keine der Linien zeigte unter den beschriebenen Bedingungen eine auffällige Wachstumshemmung. In Abb. 33 ist der typische Verlauf der Entwicklung jeder Linie dargestellt. Über den gesamten Dokumentationszeitraum entwickelten sich die Pflanzen jeder Linie gleichmäßig und zeigten keine Wachstumsverzögerungen in den einzelnen Entwicklungsstadien. Vergleicht man das Wachstum der Linien untereinander so stellt man leichte Unterschiede fest. So ist die Entwicklung der *shm6+7* Doppelmutante leicht verzögert gegenüber den anderen Linien. Dies äußert sich auch in der Blattanzahl (Abb. 34). Die Kurve zeigt die Blattentwicklung über einen Zeitraum von 14 Tagen. Man kann erkennen, dass die *shm6+7* Doppelmutante zu jedem Zeitpunkt weniger Blätter hatte, als die vergleichbaren T-DNA-Einzelmutanten oder der Wildtyp.

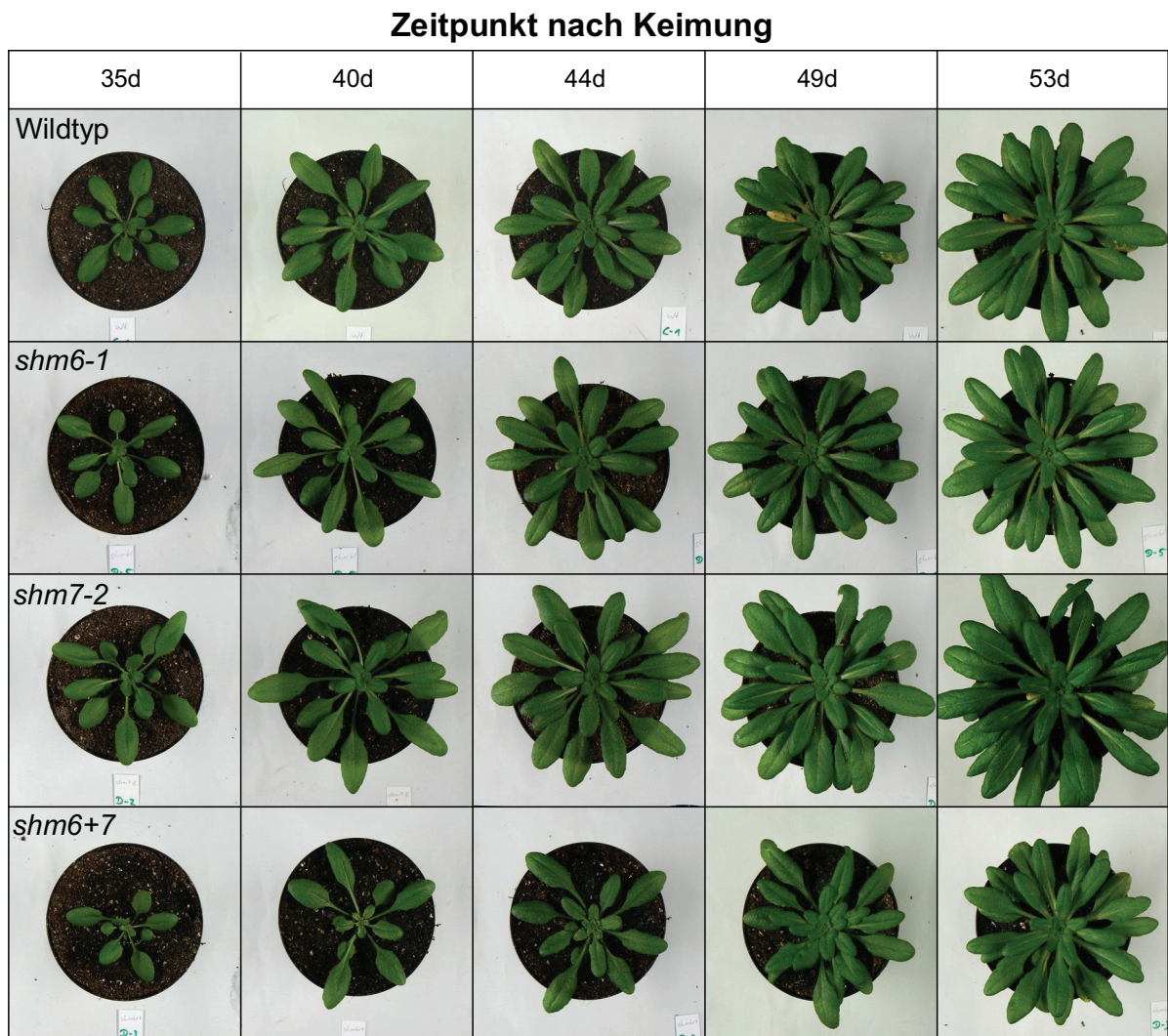


Abb. 33. Wachstum von *Arabidopsis thaliana* Col-O, *shm6-1*, *shm7-2* und *shm6+7* unter ambienten Bedingungen. Die *shm6+7* Doppelmutante ist im Mittel etwas kleiner, jedoch können sonst keine Unterschiede zu anderen Linien ausgemacht werden.

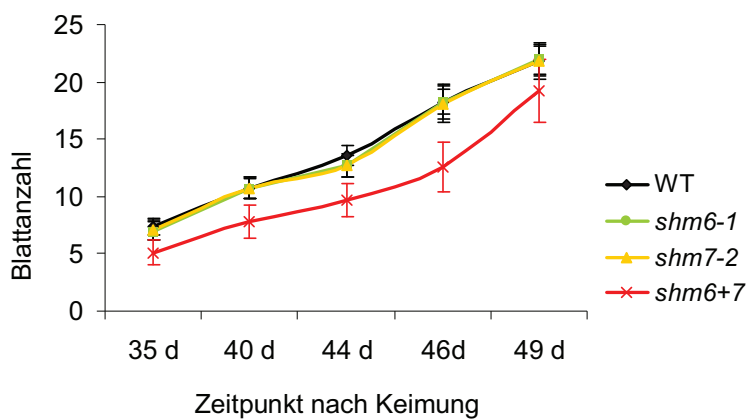


Abb. 34. Mittlere Blattzahl in den T-DNA Linien zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter Normalbedingungen. Streuung als Standardabweichung. MW \pm Standardabweichung (n=20).

Wachstum der Linien unter Salzstress

Durch Zugabe von 100 mM NaCl in das Gießwasser, wurde ein Salz- und osmotischer Stress ausgelöst. Es wird deutlich, dass dies einen geringfügigen Effekt auf das Wachstum der untersuchten Linien ausübt (Abb. 35). Der Rosettenumfang verkleinerte sich und die Blätter wirkten etwas gedrungener. Diese Beobachtung ist nicht verwunderlich, da Salzstress zu Wachstumshemmungen führt. Ansonsten verläuft der Wachstumsprozess kontinuierlich bis zur Samenreife. Eine besondere Sensitivität der *shm6+7* Doppelmutante gegenüber Salzstress konnte nicht beobachtet werden.

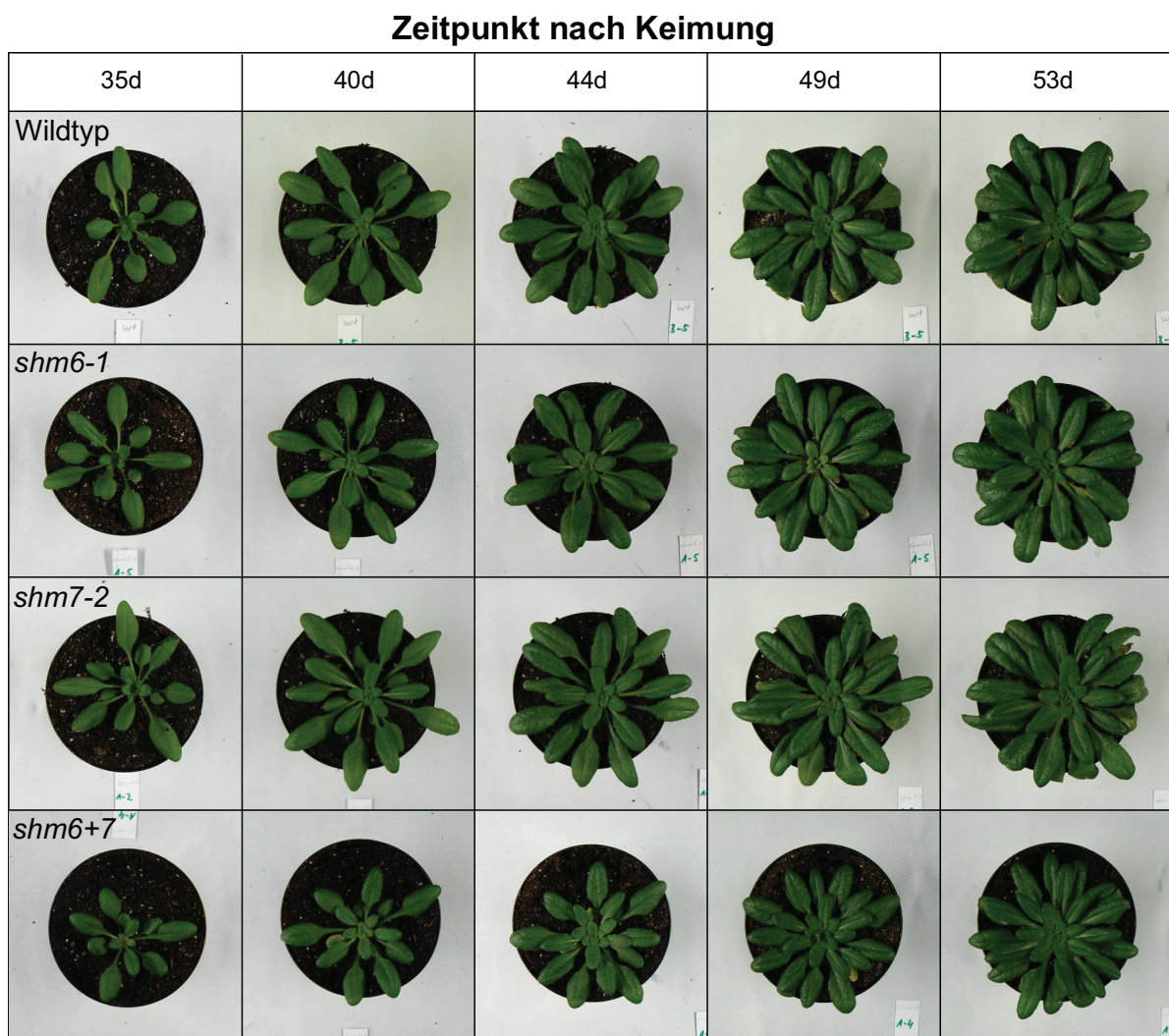


Abb. 35. Wachstum der Linien vom Beginn des Salzstresses ab Tag 35. Salzstress wurde initiiert und aufrechterhalten mit 100 mM NaCl im Gießwasser. Deutlich Unterschiede im Wachstum der Pflanzen treten nicht zum Vorschein.

3.6.4. Analyse von Primärmetaboliten in den Mutanten und Wildtyp

Die Analyse von Metaboliten des Primärstoffwechsels erfolgte mit Blattmaterial von Pflanzen im Rosettenstadium unter Normal- und Salzstressbedingungen (vgl. Abb. 33, Abb. 35 nach 44 Tagen Wachstum; 2.3.8). Ziel war es einen Ausschnitt aus der Vielzahl an Metaboliten zu erhalten. Änderungen in der Konzentration sollten Hinweise auf die metabolischen Netzwerke liefern, an denen SHMT6 und SHMT7 direkt oder indirekt beteiligt sind. Für die Analysen wurden mind. 4 Pflanzen jeder Linie verwendet. Durch GC-TOF/MS-Analyse konnten insgesamt 63 Metabolite detektiert werden, von denen 41 identifiziert wurden. Die Verbindungen sind unterschiedlichen Stoffklassen wie Aminen, Aminosäuren, Kohlenhydraten, organischen Säuren und Polyolen zuzuordnen. Zusätzlich wurde mit gleichem Pflanzenmaterial eine HPLC durchgeführt, um den Datensatz für die Aminosäuren zu vervollständigen.

Die Kohlenhydrate wurden nach ihrer Klassifikation zusammengefasst. Unter den Hexosen konnten Glucose, Fructose und Mannose identifiziert werden. Da sie in der Zelle problemlos ineinander umwandelbar sind, sind Änderungen in ihrer Gesamtheit zu betrachten. Ähnliches gilt für die Pentosen Ribose und Arabinose. Unter den Fettsäuren wurden Hexadecansäure und Octadecansäure zusammengefasst und als „Fettsäuren“ geführt. Die gefundenen Metabolite entstammen sowohl den Primär- als auch dem Sekundärmetabolismus.

Der *knock-out* in SHM6 und SHM7 soll für die Beurteilung der metabolischen Funktion wichtige Daten liefern. Sowohl ein kombinierter, als auch der Einzel-*knock-out* in einem der beiden Gene führte zu signifikanten metabolischen Änderungen im Vergleich zum Wildtyp. Durch Einwirkung von Salzstress kam es zu unterschiedlichen Anpassungen. Einige Metabolite ändern sich im Wildtyp, nicht aber in der Doppelmutante. In anderen Fällen verhielt es sich entgegengesetzt. Beide Fälle können für die Interpretation von großer Wichtigkeit sein, da sie Informationen über unterschiedliche Regulierungen von Stoffwechselprozessen enthalten.

Insgesamt sind noch zu wenige Metabolite gefunden worden, so dass weitere Untersuchungen stattfinden müssen, um das Metabolitprofil zu komplettieren. Möglicherweise können unterschiedliche Extraktionsmethoden helfen, die Gesamtanzahl der Metabolite zu erhöhen.

Metabolitspiegel unter Normalbedingungen

Die folgenden beiden Abbildungen enthalten Metabolitänderungen im Verhältnis zum Wildtyp. Aus diesem Grund sind Wildtypwerte auf den Wert 1 gesetzt.

Bei den organischen Säuren sind die Konzentrationen in den Mutantenlinien fast ausschließlich geringer als im Wildtyp (Abb. 36A). Diese Änderungen betreffen hauptsächlich die T-DNA Linien gemeinsam. Die Metabolitänderungen anderer Stoffgruppen sind dagegen verstärkt in der Doppelmutante *shm6+7* zu finden (Abb. 36B). Die Konzentrationen sind dabei gleichfalls höher und niedriger als im Wildtyp. Bei den aromatischen Aminosäuren sind, anders als im Keimlingsstadium, keine Änderungen mehr feststellbar. Auch Histidin und Methionin waren zum Wildtyp unverändert. *SHM6* und *SHM7* scheinen nicht vollständig redundant zu sein, da sich die Einzelmутanten nicht so wie der Wildtyp verhalten. Auf das Wachstum hatten die unterschiedlichen Metabolitkonzentrationen jedoch keinen Einfluss.

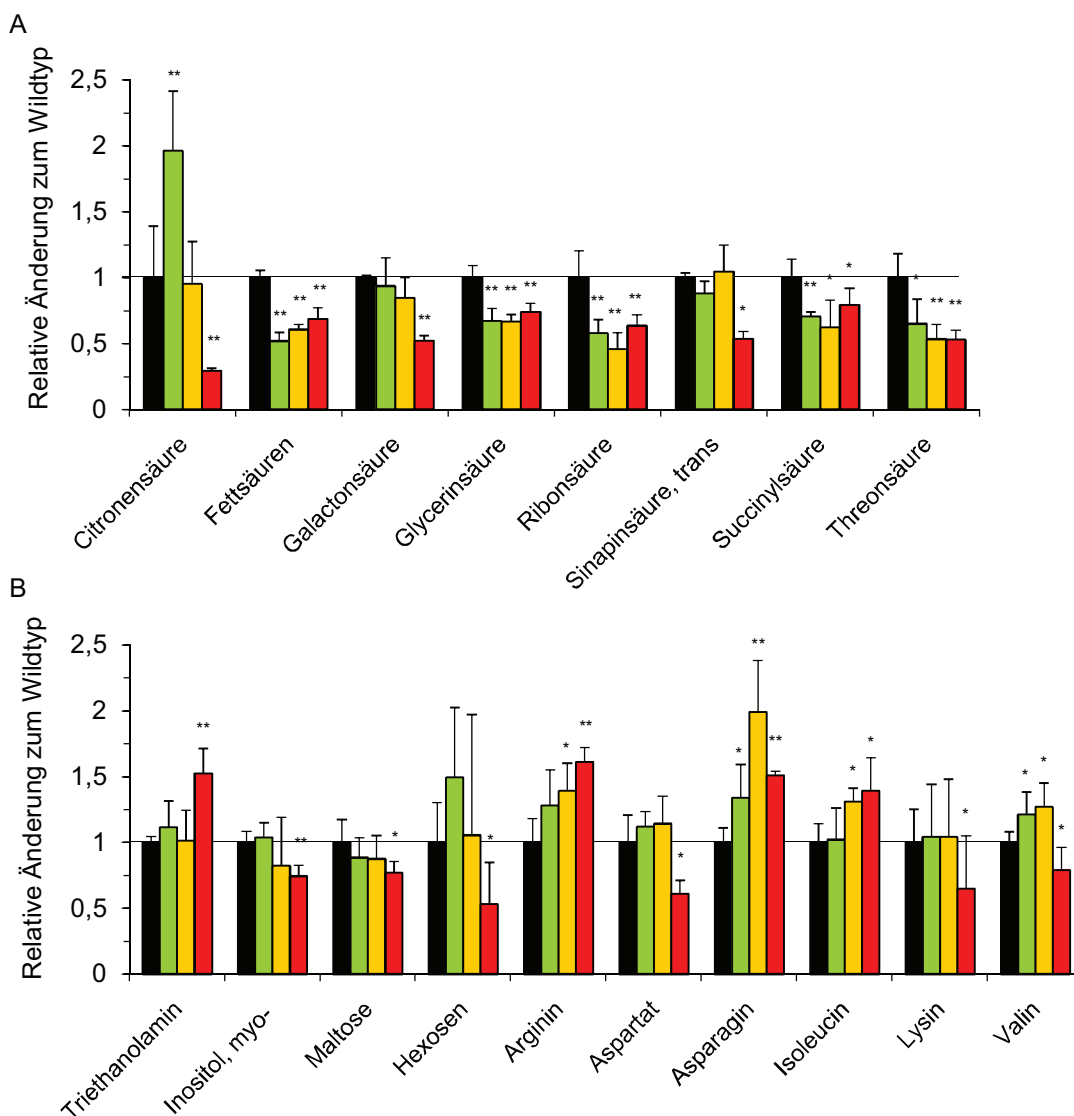


Abb. 36. Signifikante Veränderungen einzelner Metabolite in den T-DNA Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Mutante/Wildtyp-Ratio). Werte des Wildtyps wurden auf 1 gesetzt. Es sind ausschließlich jene Verbindungen dargestellt, die mindestens in der Doppelmutante veränderte Konzentrationen aufweisen. Signifikanz nach dem Ttest mit * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. Streuung als Standardabweichung der relativen Werte zum Wildtyp ($n \geq 4$).

Veränderungen im Metabolitspiegel unter Salzstress

Als Reaktion auf den Salzstress kommt es in den untersuchten Linien zu unterschiedlichen Reaktionen auf Metabolitebene. Die Abbildungen Abb. 37A, B und Abb. 38 zeigen die Veränderungen unter Salzstress.

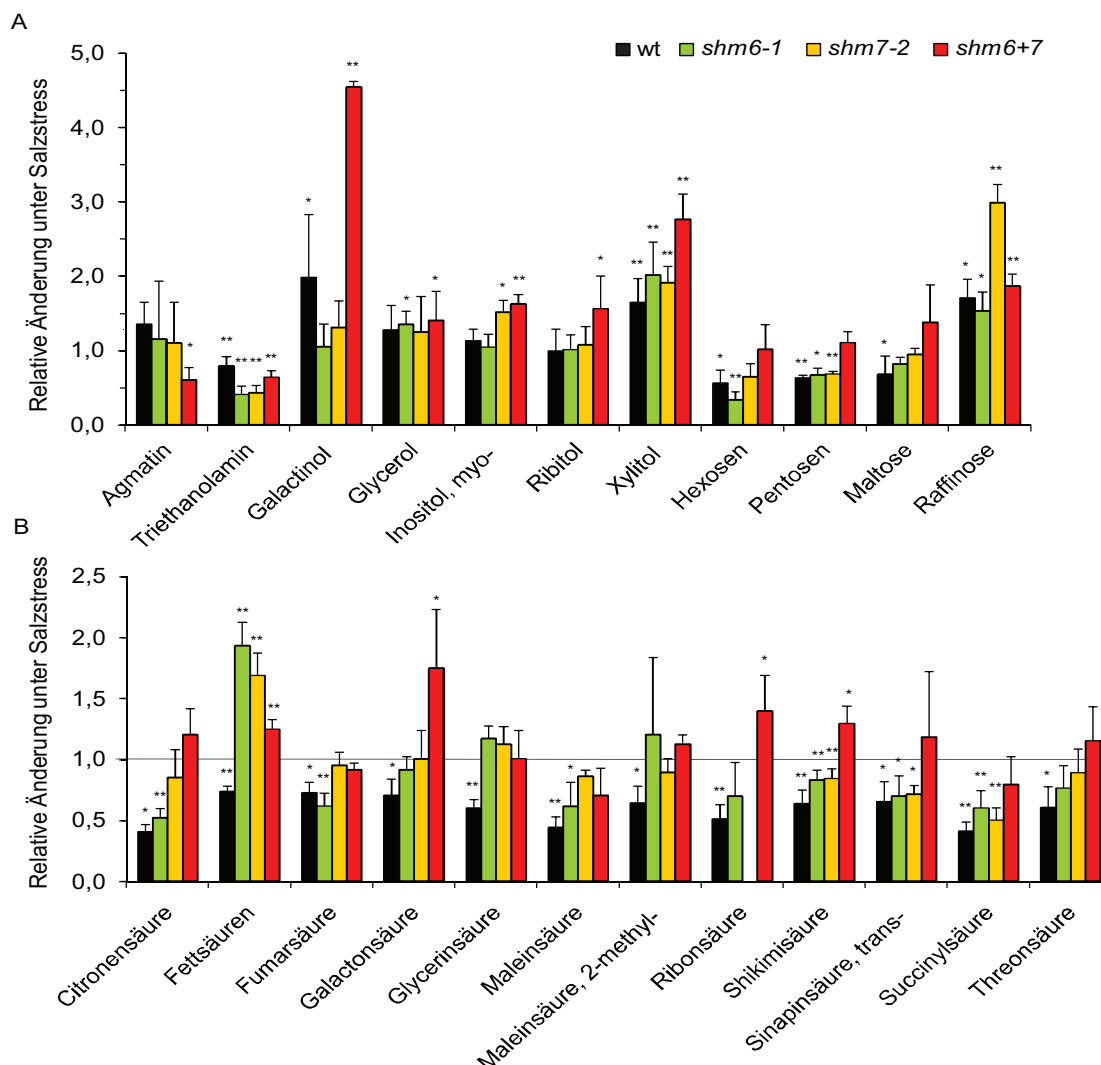


Abb. 37. Metabolitänderungen unter Salzstress. Balken repräsentieren das Verhältnis der Salzproben zu Normalbedingungen. Analyse mittels GC-MS. Signifikanz nach dem Ttest mit * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. Streuungen sind Standardabweichungen vom Mittelwert ($n \geq 4$).

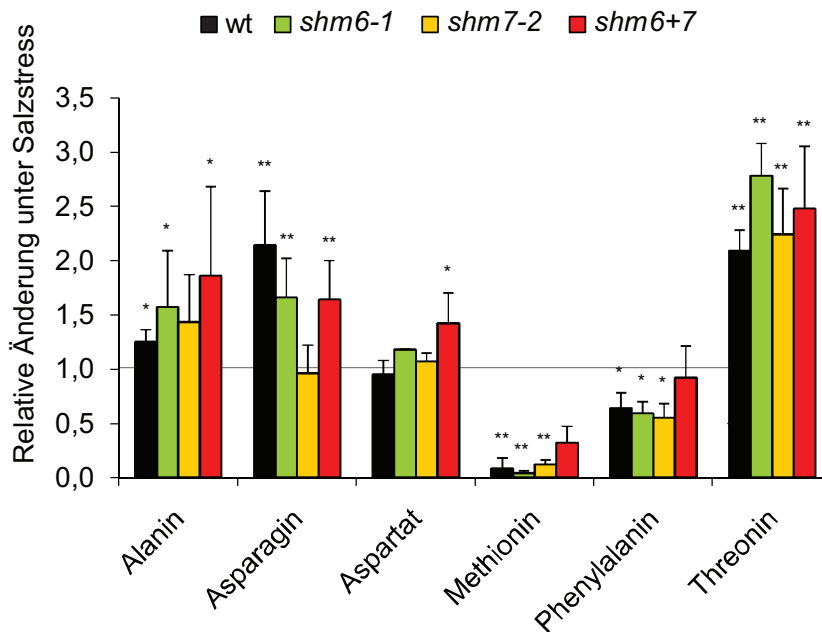


Abb. 38. Veränderungen einzelner Aminosäuren unter Salzstress in Relation zu Normalbedingungen. Analyse mittels HPLC. Statistische Signifikanz nach dem Student'schen Ttest mit * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. Streuungen als Standardabweichungen vom Mittelwert ($n \geq 4$).

Die Citratzyklusintermediate Citronensäure, Succinylsäure, Fumarsäure und Maleinsäure, sowie andere organische Säuren sind ausschließlich im Wildtyp und einer bzw. beider Einzelmutanten verändert (Abb. 37 B).

Auch bei den Monosacchariden kommt es zu keiner metabolischen Veränderung in der Doppelmutante. Die Konzentration der freien Fettsäuren dagegen steigt in den T-DNA-Linien an und fällt im Wildtyp. Solche entgegengerichtete Regulierung zwischen Wildtyp und Doppelmutante findet man ebenso bei Galactonsäure, Ribonsäure und Shikimisäure. Andere Metabolite, darunter auch Aminosäuren, sind in mehreren Linien gleichzeitig verändert.

Änderungen von Serin und Glycin

Glycin und Serin sind die bevorzugten Substrate der SHMT und werden über einen theoretischen Serin-Glycin-Zyklus zwischen den Organellen ausgetauscht. Glycin wird in den Mitochondrien zur Rückgewinnung von Serin verwendet, welches anschließend wieder im Cytosol und anderen Organellen zur Bereitstellung von C1-Verbindungen abgebaut wird.

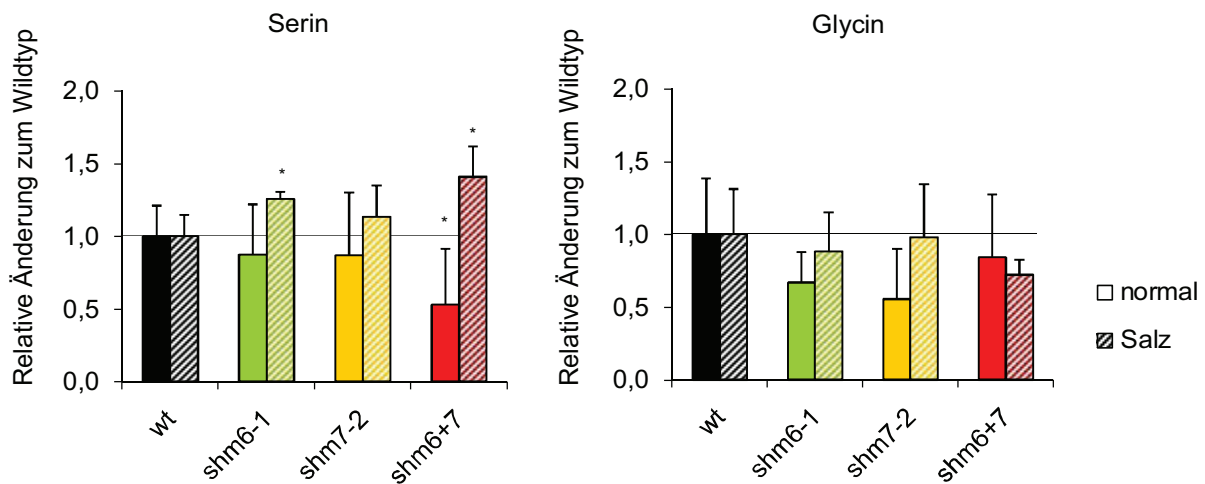


Abb. 39. Änderungen der Serin- und Glycinegehalte unter Normalbedingungen und Salzstress relativ zum Wildtyp. Analyse mittel GC-MS. Werte geben das Mutante/Wildtyp-Verhältnis wieder, wobei Wildtyp=1. Signifikanz nach Ttest dem mit * $P < 0,05$. Streuungen als Standardabweichungen vom Mittelwert des Wildtyps ($n \geq 4$).

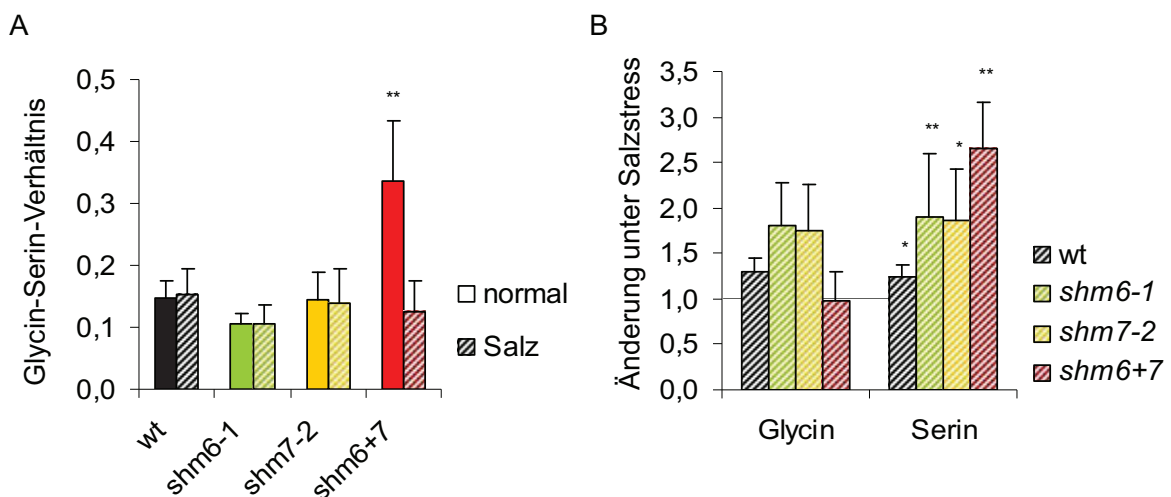


Abb. 40. A, Glycin-Serin-Verhältnis. Das Verhältnis von Glycin zu Serin ist in der Doppelmutante unter Normalbedingungen signifikant erhöht. Bei Salzstress ist keine Änderung messbar. B, Änderung der Konzentrationen von Glycin und Serin unter Salzstress (normal/Salz-Ratio). Salzstress führt zu moderaten Anstiegen bei Glycin im Wildtyp, *shm6-1* und *shm7-2*. Serin steigt in allen Linien signifikant an. Analyse mittels GC-MS. Signifikanz nach dem Ttest mit * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$. Streuungen als Standardabweichungen vom Mittelwert ($n \geq 4$).

Die Serinkonzentration in der Doppelmutante und ist im Vergleich zum Wildtyp unter Normalbedingungen signifikant geringer (Abb. 39). Der Glycingehalt ist unter diesen Bedingungen unverändert. Dies resultiert in einem etwa doppelt so hohen Glycin-Serin-Verhältnis (Abb. 40A).

Unter Salzstress ist die Serin-Konzentration höher, als im Wildtyp (Abb. 39), was

führt zu einem Glycin-Serin-Verhältnis, welches sich auf Wildtypniveau befindet. Salzstress führt auch in den Vergleichslinien zu einer Erhöhung der Serinkonzentration. Da aber Glycin ebenfalls ansteigt, gibt es im Verhältnis beider keine wesentliche Änderung zwischen Salzstress- und Normalbedingungen.

3.6.5. Einfluss von SHMT6 und SHMT7 auf die photosynthetische Leistung

In diesem Versuchsteil wurden mit Pflanzen der Linien *shm6-1*, *shm7-2* und *shm6+7*, sowie mit Col-O, die Photosyntheseraten (A) in Abhängigkeit verschiedener interzellulärer CO₂-Konzentrationen (C_i) mit einem Gaswechsellmessgerät gemessen. Als Untersuchungsmaterial dienten Pflanzen aus Abschnitt 3.6.3 nach 44 Tagen Wachstum (vgl. Abb. 33, Abb. 35). Die Beziehung der beiden Parameter wurde in einer A/C_i-Kurve graphisch dargestellt. Aus dieser ließ sich nun der CO₂-Kompensationspunkt mittels linearer Regression und Schnittpunktermittlung bestimmen. Er ist definiert als diejenige interzelluläre CO₂-Konzentration bei der es keine Netto CO₂-Aufnahme oder -Abgabe gibt. Aus physiologischer Sicht beschreibt er also den minimalen CO₂-Bedarf einer Pflanze zum Erhalt der Biomasse. Die Photosyntheserate A gibt an wie viel CO₂ durch Assimilierung netto aufgenommen wird. Sie ist bei konstanten Lichtverhältnissen und Temperatur, sowie gleich bleibender Luftzirkulation abhängig von der interzellulären CO₂-Konzentration. Durch diese beiden Parameter lassen sich eventuelle Wachstumsunterschiede erklären, da atmosphärisches CO₂ die Hauptquelle für den Aufbau von Biomasse darstellt. Bei Timm *et al.* (Timm et al. 2008) zeigt eine Arabidopsis-Mutante mit Defekt in *hpr1*, einem Gen des photorespiratorischen C₂-Zyklus, deutliche Wachstumsunterschiede bei ambienten Luftbedingungen gegenüber Pflanzen des Wildtyps. Durch Gas-Wechsellmessungen konnte hier ein Zusammenhang zwischen verringerter CO₂-Aufnahme, sowie erhöhtem CO₂-Kompensationspunkt und dem geringeren Wachstum gezeigt werden.

Gaswechsellmessungen mit den T-DNA-Linien und Wildtyp

Mit dem Licor-6400 wurden A/C_i-Kurven für mindestens 4 Individuen jeder Linie aufgenommen. Die Bedingungen waren konstant bei 250 µmol*m⁻²*s⁻¹ Lichtintensität, einer Blatttemperatur von 25 °C und 21 % Sauerstoff. Die extrazellulären CO₂-

Konzentrationen wurden durch das System schrittweise von 400 $\mu\text{l/l}$ auf 50 $\mu\text{l/l}$ reduziert. Die Netto-Photosyntheserate wurde bei 400 $\mu\text{l/l}$ CO_2 ermittelt.

Die Messdaten zu den Photosyntheseraten (Abb. 41A) weisen auf eine geringfügig geringere CO_2 Aufnahme in den T-DNA-Insertionslinien hin. Diese ist jedoch nur für die *shm6+7* Doppelmutante statistisch signifikant und könnte die Ursache für die leichte Wachstumsverzögerung sein.

Unter Salzstress kommt es beim Wildtyp zu den deutlichsten Änderungen der Photosyntheserate. Hier wurde ein signifikanter Abfall der photosynthetischen Leistung beobachtet. Die CO_2 -Kompensationspunkte (Abb. 41B) sind in allen Mutantenlinien leicht erhöht, jedoch bewegen sie sich innerhalb der statistischen Abweichungen und sind somit nicht signifikant verändert.

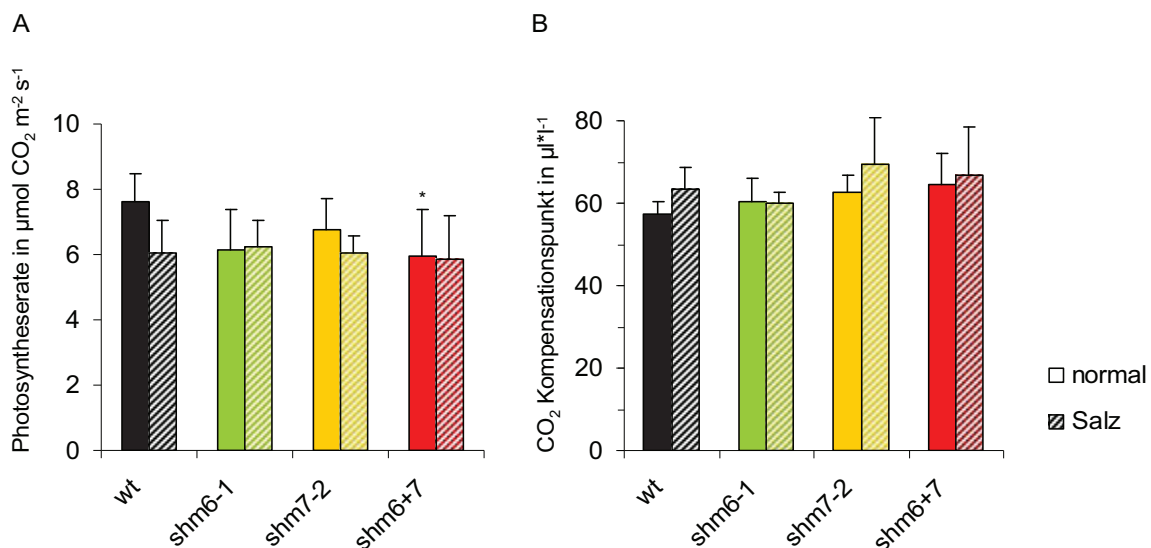


Abb. 41. Photosyntheserate (A) und CO_2 Kompensationspunkt (B) in den T-DNA-Linien, sowie Wildtyp. Statistische Signifikanz nach dem Student'schen Ttest mit $P < 0,05$. Streuungen als Standardabweichungen vom Mittelwert. Messungen an mind. 4 Individuen jeder Linie.

3.6.6. Untersuchung des Methylierungsstatus' in den *knock-out-Mutanten*

Die Untersuchungen zur Lokalisation von SHMT6 und SHMT7 belegen das Vorhandensein zweier putativer SHMT-Isoformen im Zellkern. Dies steht in Übereinstimmung mit *in-silico* Sequenzanalysen.

Zellkerne sind die Orte der Transkription und der Replikation von DNA. Die Modifizierung einzelner Basen mit Methylgruppen, vorrangig an Cytosin, ist Teil des

komplexen und bislang nur wenig verstandenen Mechanismus der Regulation der Genexpression. Die Frage nach einer *in-vivo* Funktion berührt somit auch den Bereich der DNA-Methylierung. SHMT im Zellkern könnten über die Beladung von THF mit C1-Einheiten an der Bereitstellung von Methylgruppen für DNA-Methylierungsreaktionen beteiligt sein. Voraussetzung dafür ist die katalytische Aktivität nach Abb. 1 So könnten reduzierte Methylierungslevel in den T-DNA Linien ein Hinweis auf SHMT-Aktivität im Zellkern sein.

Mit dem Sigma Imprint® Methylated DNA Quantification Kit kann der Gesamtmethylierungsstatus methylierter Cytosine in einer DNA Sequenz ermittelt werden. Der Test basiert auf spezifischen Antikörperreaktionen zum Nachweis von Methylgruppen an Cytosinresten in der DNA. In einer Farbreaktion werden die Methylgruppen visualisiert und durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm quantifiziert. Als Teil der vorliegenden Arbeit wurde dieser Test eingesetzt, um mögliche Unterschiede im Methylierungslevel zwischen den isolierten T-DNA Mutanten und dem Wildtyp festzustellen. Er ist Teil der Fragestellung, welche biologische Funktion SHMT6 und SHMT7 im Organismus Pflanze ausübt.

Der gesamte Test wurde in 2 unabhängigen Durchführungen mit jeweils 4 biologischen Replikaten je Pflanzenlinie vorgenommen. Dazu wurden Blätter von Pflanzen im Rosettenstadium (vgl. Abb. 33, Wachstum zum Zeitpunkt 40d) verwendet. Das gesamte gesunde Blattmaterial einer Pflanze wurde abgeerntet und hochmolekulare chromosomale DNA nach der CTAB-Methode (2.3.3) extrahiert. Es war darauf zu achten, dass die DNA in einem qualitativ einwandfreien Zustand vorlag, da Fragmentierung das Ergebnis verfälschen konnte. Um gleiche Mengen DNA einsetzen zu können, wurde der Gehalt der genomischen DNA einer jeden Probe photometrisch abgeglichen und auf eine Konzentration von 25 µg/µl eingestellt. Abb. 42 zeigt 100 ng DNA aus jeder Probe. Der Vergleich mit standardisierter humaner genomischer DNA (Invitrogen) belegt, dass in 4 µl Proben-DNA genau 100 ng enthalten sind.

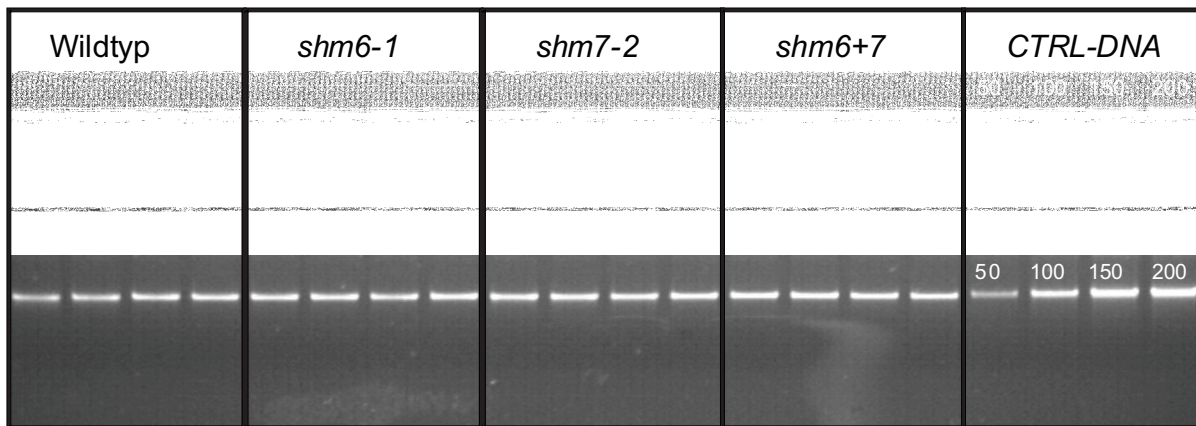


Abb. 42. Genomische DNA im Agarosegel nach Extraktion aus Pflanzengewebe. 100 ng abgeglicherer DNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt. DNA aus 2 unabhängigen Versuchsdurchführungen. Ctrl-DNA, Kontroll-DNA. Zahlenangaben in ng.

In beiden Versuchsdurchführungen wurde jeweils 100 ng DNA aus jeder Probe verwendet und die Versuche streng nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Nach Abschluss der Immunodetektion der Methylgruppen, erfolgte die Quantifizierung mittels Photometer (SpectraMax800). Die erhaltenen Messwerte der T-DNA Linien wurden in Relation zum Wildtyp gesetzt, um eventuelle Änderungen in der Methylierung zu bestimmen. Im Ergebnis waren die Einzelmutanten *shm6-1* und *shm7-2* nicht signifikant hyper- oder hypomethyliert (Abb. 43). Der Verlust einer der beiden SHMT im Zellkern führt hier offenbar zu keiner Änderung.

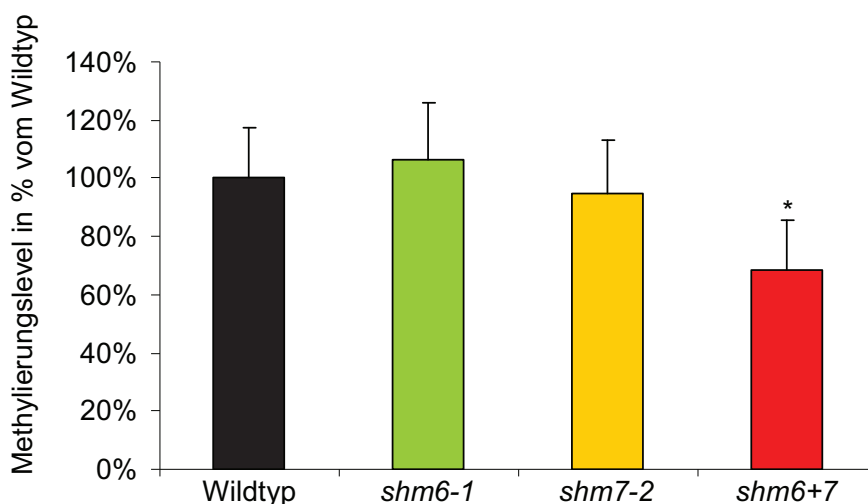


Abb. 43. Methylierungslevel in den T-DNA-Linien. *shm6+7* weist nur ~70 % des Methylierungslevels vom Wildtyp auf. Die Einzelmutanten *shm6-1* und *shm7-2* sind nicht betroffen. Statistische Signifikanz nach dem Student'schen Ttest mit $P < 0,01$. Streuungen als Standardabweichungen vom Mittelwert des Wildtyps.

Die Proben der Doppelmutante *shm6+7* dagegen weisen im Mittel ein ca. 30 % verringertes Methylierungslevel auf. Man spricht hier von einer hypomethylierten DNA. Offenbar führte der *knock-out* in den Genen *SHM6* und *SHM7* zu einer verringerten Methylierung von Cytosinresten in der chromosomalen DNA von *Arabidopsis*.

4. Diskussion

4.1. Vorkommen von SHMT6 und SHMT7

Nach bisherigem Kenntnisstand existieren nukleäre Serin-Hydroxymethyltransferasen nur in höheren Pflanzen. Die für den Import von Proteinen in den Zellkern benötigten Sequenzmotive (NLS) finden sich in der SHMT mehrerer Pflanzenspezies, wie *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Vitis vinifera* oder *Populus tremuloides* (3.1.2). Untersuchungen an Erbse belegen, dass SHMT-Aktivität nicht nur in Mitochondrien und im Cytosol, sondern auch in Zellkernen und Chloroplasten messbar ist (Neuburger et al. 1996). Dies ist nicht verwunderlich, da C1-substituiertes Tetrahydrofolat nicht aktiv über Plasmamembranen transportiert wird und somit die Zellkompartimente weitgehend autonome Folatpools bilden (Appling 1991). Folate sind jedoch essentiell für die Übertragung von C1-Einheiten in einer Reihe von Biosynthesewegen, einschließlich Transmethylierung von DNA oder Histonproteinen. Die Serin-Hydroxymethyltransferase ist das wichtigste Enzym zur Einspeisung von C1-Verbindungen in den C1-Metabolismus. Diese werden aus der Spaltung von Serin gewonnen.

4.1.1. SHMT6 und SHMT7 sind im Zellkern lokalisiert

Die Untersuchungen zur Lokalisation der Proteine SHMT6 und SHMT7 wurden an transgenen Pflanzen durchgeführt in denen ein Fusionsprotein aus SHMT und GFP gebildet wird. Mehrere stabil transformierte Arabidopsis-Linien in denen die Transkripte der Fusionsproteine nachweisbar waren, konnten erzeugt werden. Die mikroskopischen Untersuchungen an Wurzeln von 2 bis 3 Wochen alten Keimlingen zeigten klar GFP-spezifische Fluoreszenz aus identischen Strukturen für beide Konstrukte. Durch einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher spezifisch an doppelsträngige chromosomale DNA bindet, konnten diese Strukturen als Zellkerne identifiziert werden. Diese Befunde sind der Nachweis für die Kernlokalisierung zweier Genprodukte aus der *SHM*-Genfamilie.

4.1.2. Die Promotoren von SHM6 und SHM7 sind in allen Geweben aktiv

β -Glucuronidase-Aktivität in transgenen Arabidopsis-Pflanzen zeigt eine Blaufärbung in allen untersuchten Organen. Die transgenen Pflanzen enthielten das *uidA*-Gen zur Bildung der β -Glucuronidase (GUS) unter Kontrolle der Promotoren von *AtSHM6* bzw. *AtSHM7*. Diese Promotoren sind somit in Blättern, Blütenorganen, Stengel und Wurzeln aktiv. Da es sich um einen qualitativen Nachweis handelt, kann keine Aussage über die Regulierung der Promotoren getroffen werden.

Es gibt keine Hinweise auf eine differentielle Promotor- bzw. Genaktivität. Dass die Promotoren auch in verschiedenen Entwicklungsstadien aktiv waren und die Transkripte ebenfalls in allen Organen nachweisbar sind, lässt über die Bedeutung der Proteine spekulieren. Die Daten zeigen nämlich, dass keines der Proteine präferenziell genutzt wird. Vielmehr ist die Expression beider SHMT konstitutiv.

4.2. Rekombinante SHMT6 und SHMT7 zeigen keine SHMT-Aktivität im Radioassay

Mit Hilfe rekombinanter Proteine sollte der Nachweis der SHMT-Aktivität für SHMT6 und SHMT7 *in-vitro* erbracht werden. Die Strategie beinhaltete eine rekombinante Expression in *E. coli* mit nachfolgender Isolierung der Proteine durch affinitätschromatographische Reinigung. Anschließend sollte mit einem Enzymtest nach Taylor und Weissbach (Taylor and Weissbach 1965) die enzymatische Aktivität ermittelt werden. Als Referenzen dienten SHMT1 und SHMT2 aus Arabidopsis

Von den in den Vektor pHUE klonierten SHMT-Sequenzen konnten SHMT6 und SHMT7 überexprimiert und anschließend aufgereinigt werden. SHMT1 wurde zwar exprimiert, reicherte sich jedoch nach affinitätschromatographischer Reinigung nicht in den Eluatfraktionen an. Als Alternative dienten die Konstrukte pCal+*SHM1* und pCal+*SHM2*. Hier wurde rekombinantes Protein in der löslichen Proteinfraction erhalten und partiell aufgereinigt.

Mit dem verwendeten Enzymtest wurde sowohl für SHMT6, als auch für SHMT7 enzymatische Aktivität nicht ermittelt. Ein Umsatz an Serin war nicht festzustellen. Für die Referenzproteine SHMT1 und SHMT2, beides mitochondriale Isoformen, konnten spezifische Aktivitäten von ~110 mU/mg gemessen werden. Dies belegt zum

einem die Funktionalität des Enzymtests und zum anderen bestätigt es die vorhergesagte Annahme, dass es sich hierbei um Serin-Hydroxymethyltransferasen handelt.

In der Literatur liegen bislang keine Daten über rekombinante pflanzliche SHMT und deren kinetische Parameter vor, so dass Vergleichswerte aus anderen Quellen stammen. Eine rekombinante cytosolische SHMT aus Kaninchen war im letzten Reinigungsschritt mit 9,1 U/mg aktiv (di Salvo et al. 1998). Dieser Wert wird durch SHMT1 und SHMT2 nicht erreicht. Ursache könnte das Fehlen eines Interaktionspartners der SHMT aus Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* sein. Arabidopsis-Mutanten mit fehlender mitochondrialer FD-GOGAT (Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthase) zeigten nur noch reduzierte SHMT-Aktivität in Mitochondrienextrakten. Diese lässt sich *in-vivo* durch Komplementierung der Mutante mit cDNA der endogenen FD-GOGAT wiederherstellen (Jamai et al. 2009). Nur durch den Komplex aus diesem Protein und der SHMT1 kann die SHMT-Aktivität in Mitochondrien Wildtypniveau erreichen.

Für SHMT6 und SHMT7 lässt sich zu diesem Zeitpunkt festhalten, dass Serin von diesen beiden Proteinen *in-vitro* nicht umgesetzt wurde. Es ist denkbar, dass sie eine andere enzymatische Funktion erfüllen, als die einer Serin-Hydroxymethyltransferase. Dagegen sprechen jedoch Messungen an Zellkernextrakten, die klar belegen, dass SHMT-Aktivität hier vorliegt (Neuburger et al. 1996). Zudem lassen Sequenzmotivanalysen keine andere Funktion zu. Obwohl hohe Strukturähnlichkeiten mit anderen SHMT, auch mit SHMT1, vermuten lassen, dass es aktive SHMT sind, blieb der Nachweis an dieser Stelle aus. Ein Erklärungsmodell könnte analog der SHMT1 auch das Fehlen eines Interaktionspartners liefern. Solche Interaktionspartner ausfindig zu machen, ist eine Aufgabe, die zukünftige Arbeiten an SHMT6 und SHMT7 leisten müssen. Möglicherweise ließe sich durch Reinigung der Proteinfraction intakter Zellkerne ein solcher postulierter Interaktionspartner nachweisen.

4.3. Charakterisierung der T-DNA-Mutanten

Die T-DNA-Insertionsmutanten *shm6-1* (Salk_050632) und *shm7-2* (Salk_117251) tragen ein defektes Gen für SHMT6 bzw. SHMT7. Durch Untersuchungen der nächsten Pflanzengeneration wurden homozygote Mutanten erzeugt, in denen kein Transkript des entsprechenden Gens mehr nachweisbar war. Durch Kreuzen dieser Linien entstand eine neue T-DNA-Insertionslinie mit Defekt in beiden Genen. Die als *shm6+7* bezeichnete Linie trägt einen doppelten *knock-out*.

Die phänotypische Charakterisierung umfasste Keimung und Keimlingswachstum, sowie Wachstum bis zur adulten Pflanze. Messungen der Metabolitgehalte in den einzelnen Entwicklungsstadien komplettierten diese Wachstumstests. Die Untersuchungen beinhalteten auch abiotischen Stress in Form von Zugabe von 100 mM NaCl, wodurch in den Pflanzen ein Salz- und osmotischer Stress induziert wurde. Dieser sollte zusätzliche Informationen und Hinweise bringen, welche Rolle SHMT6 und SHMT7 für Arabidopsis erfüllen.

Es wurden Wachstumstests durchgeführt und ein Auszug aus der Vielzahl der Primärmetabolite erstellt. Die vorliegenden Daten zeigen, dass ein knock-out in *SHM6* und *SHM7* tatsächlich einen Einfluss auf die Physiologie von Arabidopsis ausübt. Dies betrifft die frühen Entwicklungsstadien und die adulten Pflanzen. Ein Vergleich zwischen Salzstress und Normalbedingungen zeigt zudem, dass Stress in den Mutanten zu unterschiedlichen Reaktionen im Wachstum und den Metaboliten führt.

4.3.1. Knock-out in *SHM6* und *SHM7* beeinflusst das frühe Wachstum

Betrachtet man zunächst die untersuchten Wachstumsparameter, Keimung und Wurzelwachstum, so lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem Funktionsverlust beider Gene, *AtSHM6* und *AtSHM7* und den beobachteten Veränderungen erkennen. Bei der Doppelmutante verzögert sich die Keimung der Samen deutlich bereits unter Normalbedingungen, während sich die Einzelmutanten nicht vom Wildtyp unterscheiden. Salzstress führt durch eine Minderung des Wasserpotentials zu osmotischen Stress und somit zu einer geringeren Wasseraufnahme. Dies erklärt auch die Verzögerung in der Samenkeimung in allen untersuchten Linien auf Agar mit 100 mM NaCl.

Welche Faktoren in der Doppelmutante zu der Verlangsamung der Keimung und der drastischen Abnahme der Keimfähigkeit führen, ist noch unklar. In allen Phasen der Keimung ist die Aufnahme von Wasser essentiell für die Embryoentwicklung. Zellteilungen sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht für das Wachstum verantwortlich. Vielmehr kommt es zur Ausdehnung des Zellurgors infolge Wassereintritts. Eine Störung zu diesem Zeitpunkt führt unweigerlich zu einer Wachstumsverlangsamung des Embryos. Das erste sichtbare Zeichen einer erfolgten Keimung ist der Durchtritt der Keimwurzel durch die Samenhülle. Eine Verlangsamung dieses Prozesses wird somit als Verlangsamung bzw. Verzögerung der Keimung wahrgenommen.

Der Einfluss von Hormonen auf das Keimverhalten ist komplex und erfordert eine genaue Regulierung (Kucera et al. 2005). Das Zusammenspiel von Gibberellinsäure (GA, *gibberellic acid*) und Abscisinsäure (ABA, *abscisic acid*) beeinflusst die Embryoentwicklung während der Keimung. ABA inhibiert in der späten Phase die Keimung, während GA im gesamten Prozess als positiver Regulator wirkt (Kucera et al. 2005). Tatsächlich kann exogene Gibberellinsäure die Keimung auf Salz beschleunigen und die Gesamtzahl keimfähiger Samen erhöhen. Es ist möglich, dass eine ungleiche Verteilung beider Hormone vorliegt. Auch Ethylen oder Brassinosteroide wirken positiv auf das Keimverhalten, indem sie den inhibitorischen Effekten der Abscisinsäure entgegenwirken. Pflanzenhormone wirken regulierend auf physiologische Prozesse, in dem sie über Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Genexpression nehmen. So ist es denkbar, dass die besagten Hormone auf Wachstumsregulatoren, wie die Auxine, wirken. Auxin vermittelt eine Zellwandlockerung und induziert Zellwachstum durch Turgorvergrößerung. Eine Störung der hormonell gesteuerten Signalketten könnte Einfluss auf die Auxinbiosynthese oder -verteilung haben. Für eine normale physiologische Wirkung, muss polarer Auxintransport in der Zelle sichergestellt sein. In der Wurzel sorgt Auxin für die Aufrechterhaltung der Meristeme und gravitropes Wurzelwachstum. Polarer Auxintransport in Wurzelspitzenzellen wird z.B. durch eine asymmetrische Verteilung von Auxin-Efflux-Carriern sichergestellt und Mutationen die eine apolare Verteilung verursachen, führen zu abnormem Wurzelwachstum (Blilou et al. 2005, Noutoshi et al. 2005, Willemsen et al. 2003). In der Doppelmutante ist bereits unter Normalbedingungen eine drastische Wachstumsverlangsamung der Wurzel zu beobachten, die sich durch Salzstress weiter verstärkt. Pflanzen des Wildtyps und

der Einzelmутanten dagegen reagieren auf den Salzstress nicht mit reduziertem Primärwurzelwachstum. Es ist möglich, dass verschiedene Regulationsmechanismen, unter anderem hormonell gesteuerte, in der Doppelmутante gestört sind und Salz diese noch weiter verstärkt.

Durch HPLC konnten eine Reihe von Aminosäuren detektiert werden, die in einem direkten oder indirekten Zusammenhang mit den beobachteten Effekten stehen könnten. Außer Methionin sind diese Aminosäuren signifikant erhöht. Die Anstiege in diesen Aminosäuren könnten auf eine Störung in der Regulation von Biosynthesewegen zurückzuführen sein und die Doppelmутante *shm6+7* sensibler gegen Salzstress machen

Tryptophan ist Ausgangspunkt der Indol-3-Acetat-Biosynthese, dem am häufigsten vorkommenden Auxin. Der starke Anstieg unter Salzstress kann theoretisch durch eine Inhibierung der Auxinbiosynthese hervorgerufen werden. Die Verteilung könnte dann zugunsten der grünen Pflanzenorgane stattfinden und in den Wurzeln einen Auxinmangel auslösen, der erst in einer späteren Entwicklungsphase ausgeglichen wird.

Histidin gehört zu den essentiellen Aminosäuren in Pflanzen und ein totaler *knock-out* der Biosynthese führt zu einem letalen Phänotyp (Guyer et al. 1995, Mori et al. 1995). Bereits eine Reduzierung des Histidingehaltes führt zu einer deutlichen Wachstumsänderung. Die Pflanzen der *hpa1* Mutante bilden, ähnlich *shm6+7*, stark verkürzte Wurzeln (Mo et al. 2006, Noutoshi et al. 2005) bei nahezu unbeeinflusstem Sprosswachstum. Zudem war dieser Effekt abhängig vom Entwicklungsstadium und in im adulten Stadium nicht mehr vorhanden. Ein erhöhter Histidingehalt einer *apg10*-Mutante steht in Verbindung mit der Bildung gelblich verfärbter Kotyledonen und Primärblätter (Mo et al. 2006, Noutoshi et al. 2005). Auch dieser Phänotyp ist in späteren Entwicklungsstadien verschwunden. Es ist denkbar, dass Wurzeln besonders sensitiv auf Störungen der Histidin-Homöostasis reagieren und dass sowohl verringerte, als auch erhöhte Gehalte zu phänotypischen Änderungen führen. *Shm6+7* zeigt unter Salzstressbedingungen einen Anstieg bei Histidin und den signifikantesten Wachstumseffekt. Ein Zusammenhang zwischen beiden ist denkbar. Der Grund dafür könnte eine Störung im Erhalt des Meristems durch ungerichtete Auxinverteilung oder verminderte Auxinkonzentration sein.

Valin liefert einen Teil des Kohlenstoffgerüsts für Pantothenat und ist somit an der

CoenzymA Biosynthese beteiligt. CoenzymA ist zum Beispiel Ausgangspunkt der Terpenbiosynthese zu denen auch das Pflanzenhormon Gibberellinsäure gehört. Die Akkumulierung von Valin in jungen Keimlingen könnte ein Hinweis auf eine beeinträchtigte Gibberellinsäurebiosynthese sein. Gibberelline haben Einfluss auf Wachstumsprozesse in allen Entwicklungsstadien von Arabidopsis. So wirken sie den wachstumshemmenden Effekten der Abscisinsäure bei der Keimung entgegen.

4.3.2. SHMT6 und SHMT7 sind an vielen Stoffwechselprozessen beteiligt

Verfolgt man das Wachstum aller Mutanten über das Keimlingsstadium hinaus, so sind keine Störungen vitaler Stoffwechselprozesse erkennbar. Die Wachstumsunterschiede zwischen den einzelnen Linien sind in diesem Entwicklungsstadium nur gering. So ist bei der *shm6+7* Doppelmutante nur eine schwache Wachstumsverzögerung festzustellen, die durch eine geringere Netto-CO₂-Aufnahme erklärt werden kann. Grundsätzlich wachsen die Pflanzen jeder Linie gleichmäßig bis zur Blütenbildung heran und produzieren schließlich keimfähige Samen. Die Pflanzen waren in der Lage einen 10 Tage dauernden Salzstress zu tolerieren und ein nahezu normales Wachstum beizubehalten. Photosyntheserate und CO₂-Kompensationspunkt sind in den Mutantenlinien und im Wildtyp unter diesen Bedingungen kaum verändert.

Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass sich die metabolische Situation in *shm6+7* von den anderen Linien deutlich unterscheidet und in einer frühen Entwicklungsphase im Zusammenhang mit verzögerter Keimung und reduziertem Wurzelwachstum steht. Im Rosettenstadium sind die Unterschiede nur gering, dennoch zeigen die Analysen Unterschiede in den Gehalten einer Reihe von Metaboliten. Die durch GC-TOF/MS und HPLC identifizierten Metabolite adulter Pflanzen bieten zu diesem Zeitpunkt nur ein unvollständiges Bild über die metabolische Gesamtsituation in den Pflanzen. Um das Bild zu vervollständigen müssten weitere Analysen durchgeführt werden. Sie zeigen aber dennoch klar, dass der knock-out von *SHM6* und *SHM7* zu Metabolitveränderungen führt, die mehrere Stoffwechselprozesse beeinflussen. Insbesondere Salzstress führt zu unterschiedlichen Metabolitveränderungen zwischen Wildtyp und *shm6+7*

Doppelmutante. Die beteiligten Metabolite sind verschiedenen Substanzklassen wie den Aminosäuren, Aminen, Kohlenhydraten und deren Derivaten, sowie der großen Gruppe der organischen Säuren zuzuordnen.

Bei den Aminosäuren sind signifikante Änderungen zwischen Wildtyp und den Mutanten zu beobachten. So ist die Konzentration von Serin in der *shm6+7* Doppelmutante unter Normalbedingungen unterhalb des Wildtypniveaus, jedoch bei Salzstress deutlich darüber. Die geringe Konzentration von Serin ist verantwortlich für das hohe Verhältnis von Glycin zu Serin und Ausdruck eines vermehrten Bedarfs in den Pflanzen. Es ist denkbar, dass Serin zur Bildung von C1-Verbindungen verstärkt nachgefragt wird. Zudem ist es Teil von Biosynthesen weiterer Aminosäuren, wie z.B. Tryptophan oder Cystein.

Viele Verbindungen des Primär- und Sekundärstoffwechsel werden durch Beteiligung von Aminosäuren gebildet. Sie sind Teil des Citratzyklus und liefern so indirekt Intermediate zur ATP-Synthese. Weiterhin werden Nukleotide oder Verbindungen von zellulären Signaltransduktionsketten auf der Grundlage von Aminosäuren gebildet. Einige Aminosäuren mit zusätzlichen Aminogruppen, wie Glutamat, Glutamin, Aspartat und Asparagin bilden den Kern des Stickstoffkreislaufs in der Pflanze und können als Speicher- und Transportform für Stickstoff dienen. Die wichtigste Funktion erfüllen sie jedoch als Strukturbausteine der Proteine (Singh, Plant Amino Acids, 1999). Die Unterschiede bei den Aminosäuren unter Normal- und Salzstressbedingungen sind Ausdruck einer unterschiedlichen Nutzung in verschiedenen Stoffwechselprozessen. Sie lassen sich nicht eindeutig einem oder mehrerer Prozesse zuordnen.

Andere Metabolite sind ebenfalls von besonderem Interesse, da sie direkt oder indirekt mit der Funktion von *SHM6* und *SHM7* zusammenhängen. Auch Salzstress führt zu starken metabolischen Veränderungen in den Pflanzen der *SHM6* und *SHM7*-Mutanten. Solche Metabolite sind Bestandteil einer Reihe von Biosynthesewegen und metabolischen Netzwerken.

Der *knock-out* in *SHM6* und *SHM7* beeinflusst die Synthese von Sekundärmetaboliten. Viele Verbindungen dieser großen Stoffgruppe haben ihren Ursprung in den aromatischen Aminosäuren. Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin

werden aus Chorismat über den Shikimatweg *de-novo* synthetisiert. Als Reaktion auf Salzstress kommt es in den analysierten Arabidopsislinien zu einer unterschiedlichen Regulierung des Biosyntheseweges von Phenylalanin und weitergehend der Biosynthese von Komponenten der Phenylpropanoidbiosynthese. Auch Sekundärverbindungen wie Salicylsäure, einem wichtigen Signalstoff bei der systemischen Stressantwort und Suberin, einem Zellwandpolymer, können davon betroffen sein. Die Metabolitspiegel von Shikimat, Phenylalanin und Sinapinsäure werden im Wildtyp und den *SHM6/7* Einzelmутanten unter Salzstress verringert. In der Doppelmутante dagegen sind die Konzentrationen von Sinapinsäure und Phenylalanin unverändert und diejenige von Shikimat gestiegen. Dies ist ein klares Indiz für eine unterschiedliche Regulierung dieser Stoffwechselwege unter Stressbedingungen.

Polyamine, wie Spermidin, Spermin oder Putrescin, sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt und werden für eine normale Entwicklung von Pflanzen benötigt (Tiburcio et al. 1990). Ausgangspunkt der Synthese ist Arginin, welches durch Decarboxylierung zu Agmatin umgesetzt wird. Über weitere Reaktionsschritte, an denen auch S-Adenosylmethionin beteiligt ist, entstehen die Polyamine. Wird Salzstress in der *shm6+7* Doppelmутante ausgelöst, sinkt die Konzentration von Agmatin in den Pflanzen. Es ist möglich, dass der Salzstress den Bedarf an Polyaminen in der Doppelmутante erhöht, nicht aber in den anderen Linien. Polyamine stehen im Zusammenhang mit einer Stressantwort bei osmotischem oder Salzstress (Yang et al. 2007). Die gleich bleibenden Konzentrationen in den Einzelmутanten und des Wildtyps lassen vermuten, dass *shm6+7* sensibler auf Stress reagiert.

Weitere Verbindungen, die im Zusammenhang mit Stressanpassung stehen sind die Verbindungen der Raffinose Oligosaccharidfamilie (ROF).

Solche primären Oligosaccharide leiten sich unter anderem von Raffinose und Galactinol ab. Auch die Polyolverbindung *myo*-Inositol ist in diesen Reaktionsweg an mehreren Stellen involviert. Zum Beispiel wird Galactinol durch Verknüpfung von UDP-Galactose mit *myo*-Inositol gebildet. Neben den Stoffwechselendprodukten dieses Reaktionsweges, Stachyose, Verbascose und Ajugose, sind auch Galactinol und Raffinose effektive Protektoren gegen osmotischen und oxidativen Stress (Nishizawa et al. 2008). Raffinose steigt unter Salzstressbedingungen in allen Linien

an und könnte demnach die beschriebene Funktion erfüllen. Der Anstieg von Galactinol fällt deutlich höher in der *shm6+7* Doppelmutante aus. Dazu kommt ein Anstieg von *myo*-Inositol. Beides spricht für einen höheren Bedarf an protektiven Substanzen. Der hohe Umsatz bzw. Verbrauch an Hexosen in allen Linien deutet auf eine verstärkte Verwendung für die Synthese solcher Oligosaccharide hin.

Unter den freien Fettsäuren wurden Hexa- und Octadecansäure identifiziert. Die Ester dieser Verbindungen sind z.B. Bestandteil der Cuticula oder Zellmembranen. Diese ist eine wasserundurchlässige Barriere und schirmt die Zellen der grünen Organe nach außen ab. Als Schutz vor Austrocknung oder Pathogenbefall ist sie essentiell für viele Pflanzen. Unter Normalbedingungen ist die Konzentration der Fettsäuren in allen 3 T-DNA-Linien geringer als im Wildtyp. Durch Salzstress kommt es zu einer gegensätzlichen Reaktion. Während der Wildtyp mit einer Verringerung antwortet, sind in den Mutantenlinien die Gehalte signifikant erhöht. Möglicherweise geht der Anstieg freier Fettsäuren auf einen vermehrten Bedarf für Zellmembranen oder die Bildung der Cuticula zurück.

Die Metabolitspiegel von Maltose und einigen Hexosen sind in der Doppelmutante geringer als in den Vergleichslinien, was auf einen erhöhten Bedarf zurückzuführen sein kann. Es wurde bereits diskutiert, dass unter Salzstress ein Bedarf an UDP-Galactose besteht, um Galactinol und Vertreter der Raffinose Oligosaccharidfamilie zu bilden. Monosaccharide sind wichtige Energielieferanten. Es ist auch denkbar, dass Glucose und Fructose verstärkt zur Energiegewinnung abgefragt wird. Über die Glycolyse werden diese Monosaccharide zu Pyruvat abgebaut und in den Citrat-Zyklus eingespeist.

Vergleicht man die Konzentrationsänderungen bei den Citrat-Zyklus-Intermediaten Citronensäure, Succinylsäure, Fumarsäure und Maleinsäure, so fällt auf, dass unter Salzstress eine Reduzierung in den Pflanzen des Wildtyps zu beobachten ist. In der *shm6+7* Doppelmutante dagegen bleiben die Gehalte unverändert.

Für eine detailliertere Betrachtung der involvierten Stoffwechselprozesse bzw. deren wechselseitigen Interaktionen bedarf es weiterer Untersuchungen auf dem Gebiet der Metabolomic. Gemessen an der Gesamtzahl der Primärmetabolite pflanzlicher

Organismen, erscheint die Anzahl der in dieser Arbeit identifizierten Verbindungen eher gering. So sind auch die hier aufgeführten Stoffwechselprozesse nur oberflächlich beleuchtet worden. Ein weiter Raum für Spekulationen ist gegeben, doch bieten die hier dargestellten Erklärungen eine erste Orientierung und einen Überblick über Prozesse, die durch SHMT6 und SHMT7 beeinflusst werden. Die Komplettierung mit Daten zu Sekundärmetaboliten ist unvermeidlich, wenn man die unterschiedlichen Regulationsmechanismen verstehen will. Insbesondere unter Salzstress lassen sich Unterschiede feststellen. Von Interesse dürfte hier auch die Rolle der Phytohormone sein. So wird zu klären sein, was die Gründe für die Wachstumshemmung im Keimlingsstadium verursacht.

4.3.3. Die Doppelmutante *shm6+7* ist hypomethyliert

Die Unterschiede in den Metabolitkonzentrationen sind nur gering, aber dennoch signifikant. Die vielfältigen und weite Teile des Gesamtstoffwechsels betreffenden metabolischen Veränderungen in den *shm6/7* Mutanten, insbesondere der *shm6+7* Doppelmutante, legen den Schluss nahe, dass nicht nur ein einzelner Stoffwechselweg betroffen ist. Vielmehr kommt es zwischen Wildtyp und Mutanten offensichtlich systemweit zu Unterschieden in den Regulierungsmechanismen. Woher diese weitreichenden Veränderungen in der *shm6+7* Doppelmutante kommen, konnte nicht abschließend geklärt werden. Einen wichtigen Hinweis lieferten die Untersuchungen zur Methylierung. Tatsächlich konnte gefunden werden, dass die chromosomale DNA in den Pflanzen der Linie *shm6+7* in einem zum Wildtyp hypomethylierten Zustand vorliegt. Im Vergleich zu wildtypischen Pflanzen und auch zu den Einzelmutanten, *shm6* und *shm7*, sind in der Doppelmutante etwa 30 % weniger Cytosine methyliert.

Darin zeigt sich deutlich die Wichtigkeit der beiden kernlokalisierten Proteine für physiologische Prozesse in Arabidopsis. Da Methylierung ein wichtiges Instrument der Genregulation ist, ist es denkbar, dass die beobachteten Unterschiede damit zusammenhängen.

Um ein Gen zu aktivieren bzw. um die Expression zu steigern, müssen die entsprechenden regulatorischen Sequenzen demethyliert werden. Durch Methylierung von Cytosin wird auch der Zustand des genetischen Materials geändert (Bender 2004). Als Heterochromatin ist die DNA am dichtesten verpackt und unerreichbar für die Transkriptionsmaschinerie und führt zu *gene silencing* (Jeddeloh

et al. 1998). Euchromatin ist dagegen die Zustandsform, in der die DNA am wenigsten kondensiert ist. Nur in diesem Stadium können Gene transkribiert werden (Bender 2002). Durch SHMT6 und SHMT7 werden offenbar Prozesse in Gang gesetzt oder gehalten, die über Methylierung den Zustand der DNA beeinflussen. Der totale *knock-out* führt aus bisher ungeklärten Gründen zu einer Veränderung des Zustandes der DNA im Zellkern und macht sie zugänglicher für Transkriptionsprozesse. Dies ist ein unspezifischer Vorgang und beeinflusst die Expression einer Anzahl nicht näher charakterisierter Gene. In der Folge kommt es zu den beobachteten metabolischen Veränderungen. In weiteren Arbeiten wird zu untersuchen sein, welche Gene von der eingeschränkten Methylierung betroffen sind. Der *knock-out* in den Einzelmutanten führte zu keiner Änderung des Methylierungsstatus.

Inwieweit der beobachtete Effekt auf eine direkte Wirkung der SHMT6 und SHMT7 zurückzuführen ist, bleibt zunächst Spekulation und muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Der Begriff Serin-Hydroxymethyltransferase könnte irreführend zu der Annahme führen, dass diese Proteine Methyltransferasen sind und direkt ihre Substrate methylieren. Eine solche Funktion ist bisher nicht beschrieben. Vielmehr werden nach der gängigen Theorie durch die Reaktionen der SHMT (Serin-Glycin-Interkonversion) C1-Verbindungen aus der Spaltung von Serin gewonnen und auf THF übertragen. In den Zellkompartimenten mit C1-Bedarf bilden sich weitgehend autonome *pools* substituierter THF-Derivate (Appling 1991, Basset et al. 2005), die in einem Gleichgewicht stehen. Methyl-THF liefert die Methylgruppe für Transmethylierungen im Zellkern und anderen Kompartimenten (Hanson and Roje 2001). Es wird über Methylen-THF aus der Spaltung von Serin gebildet (Abb. 4).

Der Verlust der SHMT-Aktivität müsste zu einer deutlichen Verringerung verfügbarer Methylgruppen führen, was Auswirkungen auf den globalen Methylierungsstatus der DNA haben muss. Eine globale Veränderung der Methylierung führt zu einer unspezifischen Änderung der Genexpression, wie weiter oben beschrieben. Welche phänotypischen Änderungen dies hervorruft ist nicht abzuschätzen. Die Doppelmutante zeigt die dargestellten Wachstumsunterschiede im Keimlingsstadium und Unterschiede im Metabolom. Diesen Untersuchungen zufolge zieht der *knock-out* in *SHM6* und *SHM7* keine Letalität oder eine signifikante Wachstumseinschränkung nach sich, als im Vergleich zu einer *SHM1*-defizienten

Mutante (Voll et al. 2006). Eine zum Wildtyp um 30 % reduzierte Methylierung ist für solche Effekte offenbar nicht ausreichend. Daher muss es andere Wege der Bereitstellung von Methylgruppen im Zellkern geben. Formate und Glycin wurden als weitere wichtige Substrate erwähnt (1.1.3) (Hanson and Roje 2001).

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war eine funktionelle Charakterisierung zweier putativer SHMT-Isoformen, die dem Zellkern zugeordnet werden. Nukleäre SHMT werden in mehreren Pflanzenspezies vorhergesagt, unter anderem in Reis, Pappel und Mais. Es ist gelungen einen direkten Nachweis für die Kernlokalisierung der beiden Isoformen SHMT6 und SHMT7 zu erbringen. Die GFP-Fusionsproteine waren in Wurzeln und Blättern von Arabidopsis nachweisbar und zeigten den Zellkern als Ort der Lokalisation. Damit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Serin-Hydroxymethyltransferasen außerhalb von Mitochondrien und Cytosol existieren. Zudem scheinen Pflanzen die einzigen Organismen zu sein, die SHMTs im Zellkern besitzen. Entsprechende Sequenzmotive (NLS) stimmen mit SHMT6 und SHMT7 überein.

Ein direkter Funktionsnachweis mittels *in-vitro* Enzymaktivitätsmessungen gelang nicht. In einem Enzymtest war weder für SHMT6 noch für SHMT7 eine enzymatische Aktivität nachweisbar. Wie kürzlich publiziert, benötigt SHMT1 aus Arabidopsis einen Interaktionspartner, um im Mitochondrium volle Aktivität zu entfalten (Jamai et al. 2009). Es ist denkbar, dass die kernlokalisierten SHMT ebenfalls mit anderen Proteinen interagieren müssen. Vor diesem Hintergrund kann weder bestätigt noch ausgeschlossen werden, dass es sich um Serin-Hydroxymethyltransferasen handelt. Einen wichtigen Hinweis für eine Funktion im Sinne einer SHMT liefern die Daten zur Methylierung genomischer DNA. Durch Einspeisung von C1-Verbindungen aus dem Serin-Katabolismus in den THF-pool tragen SHMT zum C1-Metabolismus bei. Ein Mangel an Methylgruppen im Zellkern führt unweigerlich zu geringerer Methylierungsaktivität und dem beobachteten hypomethylierten Zustand der chromosomalen DNA. Die Veränderung der Chromatinstruktur führte in den Pflanzen der *knock-out* Linie *shm6+7* zu signifikanten Änderungen im Metabolitpiegel.

Die Metabolitdaten von Pflanzen im adulten Stadium belegen weiterhin, dass SHMT6 und SHMT7 direkt oder indirekt die Stoffwechselprozesse von Arabidopsis beeinflussen. Obwohl ein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen Wildtyp und den *shm6/7* Mutanten nicht besteht, treten deutliche Unterschiede in der Stoffwechselsituation zutage. Die Veränderungen betreffen den Primärstoffwechsel und haben Konsequenzen auch für den Sekundärstoffwechsel.

Die signifikantesten Wachstumseffekte zeigten Pflanzen mit doppeltem *knock-out*. Es

zeigten sich deutliche Wachstumsunterschiede im Keimlingsstadium. Hier ist sowohl die Keimung, als auch das Wurzelwachstum betroffen. Welche Regulationsmechanismen involviert sind, ist offen. Es wurde die Rolle von Hormonen auf Wachstumsprozesse diskutiert. Gibberellinsäure schafft eine leichte Verbesserung der Keimung unter Salzstress. Ob Auxin ebenfalls beteiligt ist, müssen weitere Experimente zeigen. Auch die Störung der Histidin-Homöostasis könnte Ursache für die Wachstumseffekte sein.

Salzstress war geeignet das Wachstum der Doppelmutante stärker zu beeinflussen, als bei den Vergleichslinien zu beobachten. Damit einhergehend kam es auch zu unterschiedlichen Anpassungsreaktionen auf Metabolitebene. Durch die Salzstressantwort konnten eine Reihe von Stoffwechselprozessen identifiziert werden, deren Regulation sich durch den Funktionsverlust von SHMT6 und SHMT7 änderte. Eine besondere Funktion im Sekundärstoffwechsel von Arabidopsis ist denkbar.

6. Literaturverzeichnis

Abel, S. and Theologis, A. (1994) Transient Transformation of Arabidopsis Leaf Protoplasts - A Versatile Experimental System to Study Gene-Expression. *Plant Journal* **5**:421-427.

Appling, D.R. (1991) Compartmentation of Folate-Mediated One-Carbon Metabolism in Eukaryotes. *Faseb Journal* **5**:2645-2651.

Basset, G.J.C., Quinlivan, E.P., Gregory, J.F., and Hanson, A.D. (2005) Folate synthesis and metabolism in plants and prospects for biofortification. *Crop Science* **45**:449-453.

Bauwe, H. and Kolukisaoglu, U. (2003) Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *Journal of Experimental Botany* **54**:1523-1535.

Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. (1993) In-Planta Agrobacterium-Mediated Gene-Transfer by Infiltration of Adult Arabidopsis-Thaliana Plants. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie Iii-Sciences de la Vie-Life Sciences* **316**:1194-1199.

Bender, J. (2002) Plant epigenetics. *Current Biology* **12**:R412-R414.

Bender, J. (2004) DNA methylation and epigenetics. *Annual Review of Plant Biology* **55**:41-68.

Besson, V., Neuburger, M., Rebeille, F., and Douce, R. (1995) Evidence for 3 Serine Hydroxymethyltransferases in Green Leaf-Cells - Purification and Characterization of the Mitochondrial and Chloroplastic Isoforms. *Plant Physiology and Biochemistry* **33**:665-673.

Besson, V., Rebeille, F., Neuburger, M., Douce, R., and Cossins, E.A. (1993b) Effects of Tetrahydrofolate Polyglutamates on the Kinetic-Parameters of Serine Hydroxymethyltransferase and Glycine Decarboxylase from Pea Leaf Mitochondria. *Biochemical Journal* **292**:425-430.

Besson, V., Rebeille, F., Neuburger, M., Douce, R., and Cossins, E.A. (1993a) Effects of Tetrahydrofolate Polyglutamates on the Kinetic-Parameters of Serine Hydroxymethyltransferase and Glycine Decarboxylase from Pea Leaf Mitochondria. *Biochemical Journal* **292**:425-430.

Birnboim, H.C. (1983) A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid Dna. *Methods in Enzymology* **100**:243-255.

Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**:39-44.

Boldt, R., Edner, C., Kolukisaoglu, U., Hagemann, M., Weckwerth, W., Wienkoop, S., Morgenthal, K., and Bauwe, H. (2005) D-GLYCERATE 3-KINASE, the last unknown

enzyme in the photorespiratory cycle in Arabidopsis, belongs to a novel kinase family. *Plant Cell* **17**:2413-2420.

Bourguignon,J., Vauclare,P., Diallo,N., Macherel,D., Neuburger,M., and Douce,R. (1995) The glycine decarboxylase system from higher plants. *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Vol 5:11-16.

Bradford,M.M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.

Bush,D.R. (1993) Proton-Coupled Sugar and Amino-Acid Transporters in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**:513-542.

Catanzariti,A.M., Soboleva,T.A., Jans,D.A., Board,P.G., and Baker,R.T. (2004) An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins. *Protein Science* **13**:1331-1339.

Chalfie,M., Tu,Y., Euskirchen,G., Ward,W.W., and Prasher,D.C. (1994) Green Fluorescent Protein As A Marker for Gene-Expression. *Science* **263**:802-805.

Clough,S.J. and Bent,A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**:735-743.

Cossins,E.A. and Chen,L.F. (1997) Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi. *Phytochemistry* **45**:437-452.

di Salvo,M.L., Delle Fratte,S., De Biase,D., Bossa,F., and Schirch,V. (1998) Purification and characterization of recombinant rabbit cytosolic serine hydroxymethyltransferase. *Protein Expression and Purification* **13**:177-183.

Douce,R., Bourguignon,J., Neuburger,M., and Rebeille,F. (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* **6**:167-176.

Finn,R.D., Mistry,J., Tate,J., Coggill,P., Heger,A., Pollington,J.E., Gavin,O.L., Gunasekaran,P., Ceric,G., Forslund,K., Holm,L., Sonnhammer,E.L.L., Eddy,S.R., and Bateman,A. (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38**:D211-D222.

Fontes,M.R.M., Teh,T., Jans,D., Brinkworth,R.I., and Kobe,B. (2003) Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α . *Journal of Biological Chemistry* **278**:27981-27987.

Guyer,D., Patton,D., and Ward,E. (1995) Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants. *Brighton Crop Protection Conference, Weeds - 1995*, Vols 1-3:843-850.

Hagemann,M., Vinnemeier,J., Oberpichler,I., Boldt,R., and Bauwe,H. (2005) The glycine decarboxylase complex is not essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Plant Biology* **7**:15-22.

Hanahan,D. (1983) Studies on Transformation of *Escherichia-Coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**:557-580.

- Hanson,A.D. and Roje,S.** (2001) One-carbon metabolism in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **52**:119-137.
- Harrison,S.J., Mott,E.K., Parsley,K., Aspinall,S., Gray,J.C., and Cottage,A.** (2006) A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. Plant Methods **2**:19.
- Haseloff,J., Siemering,K.R., Prasher,D.C., and Hodge,S.** (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**:2122-2127.
- Heim,R., Prasher,D.C., and Tsien,R.Y.** (1994) Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**:12501-12504.
- Imeson,H.C., Zheng,L.L., and Cossins,E.A.** (1990) Folylpolyglutamate Derivatives of *Pisum-Sativum* I Determination of Polyglutamate Chain Lengths by High-Performance Liquid-Chromatography Following Conversion to Para-Aminobenzoylpolyglutamates. Plant and Cell Physiology **31**:223-231.
- Inoue,H., Nojima,H., and Okayama,H.** (1990) High-Efficiency Transformation of *Escherichia-Coli* with Plasmids. Gene **96**:23-28.
- Jamai,A., Salome,P.A., Schilling,S.H., Weber,A.P.M., and McClung,R.** (2009) *Arabidopsis* Photorespiratory Serine Hydroxymethyltransferase Activity Requires the Mitochondrial Accumulation of Ferredoxin-Dependent Glutamate Synthase. Plant Cell **21**:595-606.
- Jeddeloh,J.A., Bender,J., and Richards,E.J.** (1998) The DNA methylation locus DDM1 is required for maintenance of gene silencing in *Arabidopsis*. Genes & Development **12**:1714-1725.
- Kucera,B., Cohn,M.A., and Leubner-Metzger,G.** (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Science Research **15**:281-307.
- Laemmli,U.K.** (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. Nature **227**:680-&.
- Laing,W.A., Ogren,W.L., and Hageman,R.H.** (1974) Regulation of Soybean Net Photosynthetic Co₂ Fixation by Interaction of Co₂, O₂, and Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase. Plant Physiology **54**:678-685.
- Martini,F., Angelaccio,S., Pascarella,S., Barra,D., Bossa,F., and Schirch,V.** (1987) The Primary Structure of Rabbit Liver Cytosolic Serine Hydroxymethyltransferase. Journal of Biological Chemistry **262**:5499-5509.
- McClung,C.R., Hsu,M., Painter,J.E., Gagne,J.M., Karlsberg,S.D., and Salome,P.A.** (2000) Integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway. Circadian regulation of two *arabidopsis* genes encoding serine hydroxymethyltransferase. Plant Physiology **123**:381-391.
- Mitchell,M.K., Reynolds,P.H.S., and Blevins,D.G.** (1986) Serine

Hydroxymethyltransferase from Soybean Root-Nodules - Purification and Kinetic-Properties. *Plant Physiology* **81**:553-557.

Mo,X.R., Zhu,Q.Y., Li,X., Li,J., Zeng,Q.N., Rong,H.L., Zhang,H.M., and Wu,P. (2006) The hpa1 mutant of Arabidopsis reveals a crucial role of histidine homeostasis in root meristem maintenance. *Plant Physiology* **141**:1425-1435.

Mori,I., Fonnepister,R., Matsunaga,S., Tada,S., Kimura,Y., Iwasaki,G., Mano,J., Hatano,M., Nakano,T., Koizumi,S., Scheidegger,A., Hayakawa,K., and Ohta,D. (1995) A Novel Class of Herbicides - Specific Inhibitors of Imidazoleglycerol Phosphate Dehydratase. *Plant Physiology* **107**:719-723.

Mouillon,J.M., Aubert,S., Bourguignon,J., Gout,E., Douce,R., and Rebeille,F. (1999) Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *Plant Journal* **20**:197-205.

Murray,M.G. and Thompson,W.F. (1980) Rapid Isolation of High Molecular-Weight Plant Dna. *Nucleic Acids Research* **8**:4321-4325.

Neuburger,M., Bourguignon,J., and Douce,R. (1986) Isolation of A Large Complex from the Matrix of Pea Leaf Mitochondria Involved in the Rapid Transformation of Glycine Into Serine. *Febs Letters* **207**:18-22.

Neuburger,M., Rebeille,F., Jourdain,A., Nakamura,S., and Douce,R. (1996) Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry* **271**:9466-9472.

Nishizawa,A., Yabuta,Y., and Shigeoka,S. (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage[. *Plant Physiology* **147**:1251-1263.

Noutoshi,Y., Ito,T., and Shinozaki,K. (2005) Albino and Pale Green 10 Encodes Bbmii Isomerase Involved in Histidine Biosynthesis in Arabidopsis Thaliana. *Plant and Cell Physiology* **46**:1165-1172.

Ogren,W.L. (1984) Photorespiration - Pathways, Regulation, and Modification. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **35**:415-442.

Oliver,D.J. (1994) The Glycine Decarboxylase Complex from Plant-Mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**:323-337.

Ramesh,K.S. and Rao,N.A. (1980) Purification and Physicochemical, Kinetic and Immunological Properties of Allosteric Serine Hydroxymethyltransferase from Monkey Liver. *Biochemical Journal* **187**:623-636.

Rao,N.A., Talwar,R., and Savithri,H.S. (2000) Molecular organization, catalytic mechanism and function of serine hydroxymethyltransferase - a potential target for cancer chemotherapy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **32**:405-416.

Renwick,S.B., Snell,K., and Baumann,U. (1998) The crystal structure of human cytosolic serine hydroxymethyltransferase: a target for cancer chemotherapy. *Structure* **6**:1105-1116.

- Roje,S.** (2006) S-Adenosyl-L-methionine: Beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* **67**:1686-1698.
- Schirch,L. and Peterson,D.** (1980) Purification and Properties of Mitochondrial Serine Hydroxymethyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **255**:7801-7806.
- Schirch,V., Hopkins,S., Villar,E., and Angelaccio,S.** (1985) Serine Hydroxymethyltransferase from Escherichia-Coli - Purification and Properties. *Journal of Bacteriology* **163**:1-7.
- Schjoerring,J.K., Mack,G., Nielsen,K.H., Husted,S., Suzuki,A., Driscoll,S., Boldt,R., and Bauwe,H.** (2006) Antisense reduction of serine hydroxymethyltransferase results in diurnal displacement of NH₄⁺ assimilation in leaves of *Solanum tuberosum*. *Plant Journal* **45**:71-82.
- Schwarte,S. and Bauwe,H.** (2007) Identification of the photorespiratory 2-phosphoglycolate phosphatase, PGLP1, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **144**:1580-1586.
- Somerville,C.R. and Ogren,W.L.** (1982) Genetic-Modification of Photo-Respiration. *Trends in Biochemical Sciences* **7**:171-174.
- Sukanya,N., Vijaya,M., Savithri,H.S., Radhakrishnan,A.N., and Rao,N.A.** (1991) Serine Hydroxymethyltransferase from Mung Bean (*Vigna-Radiata*) Is Not A Pyridoxal-5'-Phosphate-Dependent Enzyme. *Plant Physiology* **95**:351-357.
- Taylor,R.T. and Weissbach,H.** (1965) Radioactive Assay for Serine Transhydroxymethylase. *Analytical Biochemistry* **13**:80-&.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**.
- Tiburcio,A.F., Figueras,X., Claparols,I., Santos,M., and Torne,J.M.** (1990) Polyamines and Aging - Effect of Polyamine Biosynthetic Inhibitors on Plant-Regeneration in Maize Callus Cultured Invitro. *Plant Aging* **186**:277-284.
- Timm,S., Nunes-Nesi,A., Pamik,T., Morgenthal,K., Wienkoop,S., Keerberg,O., Weckwerth,W., Kleczkowski,L.A., Fernie,A.R., and Bauwe,H.** (2008) A Cytosolic Pathway for the Conversion of Hydroxypyruvate to Glycerate during Photorespiration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**:2848-2859.
- Turner,S.R., Ireland,R., Morgan,C., and Rawsthorne,S.** (1992) Identification and Localization of Multiple Forms of Serine Hydroxymethyltransferase in Pea (*Pisum-Sativum*) and Characterization of A Cdna-Encoding A Mitochondrial Isoform. *Journal of Biological Chemistry* **267**:13528-13534.
- Voll,L.M., Jamai,A., Renne,P., Voll,H., McClung,C.R., and Weber,A.P.M.** (2006) The photorespiratory *Arabidopsis* shm1 mutant is deficient in SHM1. *Plant Physiology* **140**:59-66.
- Wang,W.X., Vinocur,B., and Altman,A.** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**:1-14.

Willemsen,V., Friml,J., Grebe,M., van den Toorn,A., Palme,K., and Scheres,B. (2003) Cell polarity and PIN protein positioning in Arabidopsis require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell* **15**:612-625.

Yang,L., Zhu,Y., Hu,C., Liu,Z., Zhang,G., and Wei,G. (2007) Effects of NaCl stress on polyamine contents in grafted cucumber leaves. *Yingyong Shengtai Xuebao* **18**:831-836.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
AtSHMT	Serin-Hydroxymethyltransferase in <i>A. thaliana</i>
<i>AtSHM</i>	Gen der Serin-Hydroxymethyltransferase in <i>A. thaliana</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
CI	Chloroform-Isoamylalkohol
Col-0	Columbia 0, <i>A. thaliana</i> Genotyp
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid
DIG	Digitonin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
et al.	et alteri (lat.: und andere)
h	hour(s), Stunde(n)
HCl	Salzsäure
<i>in-silico</i>	Bezeichnung für Informationen aus digitaler Quelle
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton, Molmasse von Proteinen
MSTFA	N-Methyl-N-trifluoroacetamide
MW	Mittelwert
Na	Natrium
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfleurid
ppm	parts per million
RNaseA	Ribonuklease A

RT	Raumtemperatur
SHM	SHMT-Gen (McClung et al. 2000)
SHMT	Serin-Hydroxymethyltransferase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris/EDTA
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofolat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VT	Volumenteil
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen

7.2. Vektoren und Oligonukleotide

Tabelle 15. Verwendete Vektoren.

Vektor	Verwendung	Ursprung
pGEM-T	TA-Klonierung von PCR-Produkten	PROMEGA
pCambia1302	GFP-Fusionskonstrukte	www.cambia.org
pCambia1381	Promotor-GUS-Konstrukte	www.cambia.org
pHUE	Heterologe Expression von SHMT	(Catanzariti et al. 2004)
pCal-n	Heterologe Expression von SHMT	Strategene

Tabelle 16. Verwendete Oligonukleotide

Nr.	Primer	Primersequenz	Verwendung
R15	SHMTT12-S1	CCTAAGATWCTTATTTGTGGTGGGAG	SHM6/7 Screening
R18	SHMTT1-A1n	TATCGGTGCCACCTGTTATCAGCT	SHM6 Screening
R19	SHMTT2-A1n	TGTCTGTACCACCAGTAACCACTC	SHM7 Screening
R175	mLB1	AATCAGCTGTTGCCCCGTCTCACTGGTGAA	T-DNA left border
R176	40S16forward	GGCGACACAACCAGCTACTGA	Konstitutive Kontrolle
R177	40S16revers	CGGTAACCTCTTCTGGTAACGA	Konstitutive Kontrolle
R250	AtSHM6-Beg	GATTTTGGCCATGGACCGTATAGCTC	GFP-Fusion
R251	AtSHMT7-Beg	CAACGTCCATGGATTTGAGTCGTTCTC	GFP-Fusion
R252	AtSHM6-End	CAGGCTGACACTAGTGTCAAAGGCAG	GFP-Fusion
R253	AtSHM7-End	GTTGTGTGGAGTTTACTAGTTTCAATTCG	GFP-Fusion
R264	AtSHMT6-Stop	CAGGCTGACTCCCATGGCAAAGGCAGG	Screening
R918	SHM7pHUE-5	AAGAATTCATGGATTTGAGTCGTTCTCAAAC	Klonierung mit <i>EcoRI</i>
R919	SHM7pHUE-3	AAGGTACC TCATTCAATTCGAATAAGAGAAGCAGG	Klonierung mit <i>KpnI</i>
R929	SHM6pHUE-5	AAGAGCTCATGGACCGTATAGCTCAATCAGATCTC	Klonierung mit <i>SacI</i>
R930	SHM6pHUE-3	AAGTCGACTCACATGTCAAAGGCAGGCATTGC	Klonierung mit <i>SalI</i>
R943	EFGP3'	AAGGTAACCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG	3' eGFP, <i>BstEII</i>
R976	AtSHM1_SacII_fw	AACTCCGCGGTGGTTCTTTGCCAGTGAA	Klonierung mit <i>SacII</i>
R977	AtSHM1_SalI_rev	GCGTCGACTTAGTTCTTGTACTTCATGGT	Klonierung mit <i>SalI</i>
R998	AtSHM2_KpnI_rev	GGT ACC CTA CTC TTT GTA TCT CAT CGT	Klonierung mit <i>KpnI</i>
R1000	AtSHM2_SacII_fw	CTCCGCGGTGGTTCTTTATCAACCGCAGCT	Klonierung mit <i>SacII</i>
R994	3'-pRT103-GUS	CCAGACTGAATGCCACAGGCC	GUS-screening
P39	PSHM6_5-BamHI	AAGGATCCGCAGAGAACTAGTAACA	Promotor:GUS
P40	PSHM6_3-NcoI	TATACGGTCCATGGCCAACTAGAAGA	Promotor:GUS
P41	PSHM7_5-BamHI	AAGGATCCAGTTTTTGAGATCAGGTT	Promotor:GUS
P42	PSHM7_3-NcoI	ACTCAAATCCATGGACGTTGAAGATGA	Promotor:GUS
P142	SHM6 fw RT	ACC GTA TAG CTC AAT CAG AT	Screening
P143	SHM6 fw PLP	TGC GAT ATT GTT ACC TCA AC	Screening
P144	SHM6 rev RT	AGG CAT TGC AAA CTG AGT AG	Screening
P145	SHM7 fw RT	TGA CAT AGT AAC CTC CAC TAC TCA	Screening
P148	SHM7 rev RT	TAA GAG AAG CAG GCA TCT CA	Screening

Tabelle 17. Übersicht der verwendeten Konstrukte.

Vektor	Insert	Primer	Restriktion
pCambia1302	GFP ORF	R717, R943	<i>SpeI</i> , <i>BstEII</i>
pCambia1302	<i>AtSHM6</i> kodierende Sequenz	R250, R252	<i>NcoI</i> , <i>SpeI</i>
pCambia1302	<i>AtSHM7</i> kodierende Sequenz	R251, R253	<i>NcoI</i> , <i>SpeI</i>
pCambia1381	<i>PSHM6</i> , <i>AtSHM6</i> Promotor+5'UTR	P39, P40	<i>BamHI</i> , <i>NcoI</i>
pCambia1381	<i>PSHM7</i> , <i>AtSHM7</i> Promotor+5'UTR	P41, P42	<i>BamHI</i> , <i>NcoI</i>
pHUE	<i>AtSHM6</i> kodierende Sequenz	R929, R930	<i>SacI</i> , <i>Sall</i>
pHUE	<i>AtSHM7</i> kodierende Sequenz	R918, R919	<i>EcoRI</i> , <i>KpnI</i>
pHUE	<i>AtSHM1</i> kodierende Sequenz	R976, 977	<i>SacII</i> , <i>Sall</i>
pHUE	<i>AtSHM2</i> kodierende Sequenz	R1000, R998	<i>SacII</i> , <i>KpnI</i>
pCal-n	<i>AtSHM6</i> kodierende Sequenz	R250, R264	<i>NcoI</i>
pCal-n	<i>AtSHM7</i> kodierende Sequenz	R251, R264	<i>NcoI</i>
pCal-n	<i>AtSHM1</i> kodierende Sequenz	R254, R255	<i>BamHI</i>
pCal-n	<i>AtSHM2</i> kodierende Sequenz	R256, R257	<i>BamHI</i>

7.3. Sequenzen

AtSHM1, kodierende Sequenz

```

      R254 >
      ATGGCGATGG CCATG
1  ATGGCGATGG CCATGGCTCT TCGAAGGCTT TCTTCTTCAA TTGACAAACC CATTCGTCCT CTTATTCGAT
      R976 >
      AACT CCGCGGTGGT TCTTTGCCCA GTGAA
71  CCACTTCATG TTACATGTCT TCTTTGCCCA GTGAAGCTGT TGATGAGAAG GAAAGATCTC GTGTCACTTG
141  GCCAAAACAG CTTAACGCAC CTTTAGAGGA GGTTGATCCT GAGATTGCTG ACATTATTGA GCATGAGAAA
211  GCTAGACAAT GGAAGGGACT TGAACCTATT CCATCTGAGA ACTTCACATC TGTGTCGGTG ATGCAAGCTG
281  TTGGGTCTGT CATGACTAAC AAATACAGTG AAGGCTATCC TGGTGCCAGA TACTATGGAG GAAATGAGTA
351  TATAGACATG GCAGAAACCT TATGCCAGAA GCGCGCTCTT GAAGCTTTCC GGTTAGATCC TGAAAAGTGG
421  GGAGTGAATG TTCAACCTTT GTCTGGATCT CCTGCCAACT TCCATGTGTA CACTGCATTG TTAAAGCCCTC
491  ATGAAAGAAT CATGGCACTT GATCTTCCTC ATGGTGGTCA TCTTCTCAT GGTATCAGA CTGACACCAA
561  GAAGATATCA CGTGTGTCTA TCTTCTTTGA AACAATGCCC TATAGATTGG ACGAGAGCAC TGGCTACATC
631  GACTACGATC AGATGGAGAA AAGTGCTACT CTTTTCAGGC CAAAATTGAT TGTGCTGGT GCAAGTGCTT
701  ATGCTAGATT GTATGACTAT GCCCGCATCA GAAAGGTCTG TAACAAGCAA AAAGCTGTAA TGCTAGCAGA
771  TATGGCACAC ATCAGTGGTT TGGTTGCTGC TAATGTAATC CCTTCACCGT TCGACTATGC TGATGTTGTA
841  ACCACCACAA CTCACAAGTC ACTTCGTGGA CCCCCTGGAG CCATGATTTT CTTCAGAAAG GGTGTTAAGG
911  AAATTAACAA GCAAGGGAAA GAGGTTTTGT ATGATTTTGA AGACAAGATC AACCAAGCTG TCTTCCCTGG
981  TCTTCAAGGT GGTCCACACA ACCACACTAT CACAGGACTA GCTGTTGCTT TGAAACAGGC AACTACTTCA
1051 GAGTACAAAG CATACCAAGA ACAAGTCCTG AGTAACAGTG CAAAGTTTGC TCAGACTCTA ATGGAGAGAG
1121 GATATGAATG TGTTCCTGGT GGAAC TGACA ACCATCTGGT TCTAGTGAAT CTAAAGCCCA AGGGAATTGA
1191 TGGATCTAGA GTTGAGAAAG TGTGGAAGC TGTTACATT GCATCCAACA AAAACACTGT TCCTGGAGAT
1261 GTTCTGCCA TGGTTCCTGG TGGAATCAGA ATGGGTACTC CTGCTCTCAC TTCCAGAGGC TTTGTTGAGG
1331 AAGACTTTGC CAAAGTAGCT GAATACTTCG ACAAAGTGT GACAATAGCT CTCAAAGTCA AATCTGAAGC

```

```

1401 TCAAGGAACC AAGTTGAAGG ATTTCTGTGTC AGCAATGGAA TCCTCTTCAA CCATCCAATC CGAGATTGCG
      < R977
      TGGTACT
1471 AAACGTGCGC ATGAAGTCGA GGAATTCGCT AAGCAGTTCC CAACAATTGG GTTTGAGAAA GAAACCATGA
      R977
      TCATGTTCTT GATT
      < R255
      CATGTTCTT CCTA
1541 AGTACAAGAA CTAA

```

AtSHM2, kodierende Sequenz

```

      R256 >
      ATGGCGTTGG CTC
1  ATGGCGTTGG CTCTTCGTAG ACTCTCCTCT TCCGTTAAGA AACCGATCTC GCTTCTCTCC TCTAATGGCG
      R1000 >
      CT CCGCGGTGGT TCTTTATCAA CCGCAGCT
71  GTTCACTCCG TTTCATGTCG TCTTTATCAA CCGCAGCTAT GGCGGAATCG GAGAAATCTC GTTCTAGTTG
141  GATTAAGCAA TTGAATGCAT CTCTAGATGA AATCGATCCT GAAGTTGCGG ATATTATCGA ATTAGAGAAG
211  GCTAGACAAAT GGAAGGGATT TGAAC TTATA CCGTCAGAGA ATTTCACTTC TCTATCTGTG ATGCAAGCCG
281  TTGGTTCTGT TATGACTAAT AAGTATAGTG AAGGATACCC TGGAGCTAGA TACTATGGAG GAAATGAGTA
351  CATTGACATG GCTGAGACAT TATGTCAAAA ACGCGCATTA GAAGCTTTTC AGTTAGATCC TTCTAAATGG
421  GGAGTCAATG TGCAGTCTTT ATCAGGATCA CCAGCTAATT TCCAAGTTTA CACTGCATTG TTGAAGCCTC
491  ATGAAAGAAT CATGGCACTT GATTTACCTC ATGGTGGACA TCTTTCTCAT GGTTATCAGA CTGACACGAA
561  GAAAATATCG GCTGTATCCA TCTTTTTTGA GACAATGCCA TACAGATTGG ATGAGAACAC TGTTTACATT
631  GATTATGACC AGCTAGAAAA GAGTGCCGTG CTTTTTCAGAC CGAAACTTAT TGTTGCGGGT GCAAGTGCTT
701  ATGCTCGTCT ATATGACTAT GCACGTATTC GTAAGGTCTG TAACAAGCAA AAGGCAGTTA TGTTGGCTGA
771  TATGGCTCAT ATTAGTGGGT TGGTTGCTGC TGGCGTTATT CCTTCTCCTT TTGAGTATGC AGATGTTGTT
841  ACGACTACAA CTACAAAAATC GCTTCGCGGT CTAGAGGGG CTATGATATT CTTTAGGAAG GGGTTAAAAG
911  AGATTAACAA ACAAGGGAAA GAGGTCATGT ATGACTATGA GGACAGAATT AATCAAGCTG TTTTCTCTGG
981  ACTGCAAGGT GGTCCACATA ATCACAATAT AACGGGTCTA GCAGTTGCTC TGAAGCAGGC AAGAACTCCT
1051 GAGTACAAGG CCTACCAGGA TCAAGTTCTC CGTAATTGCT CAAAGTTTGC TGAGTTGGAT ATAAGACCTA
1121 CTGTAATCAT CTCATATGGC TTGTCAATGC AGACTTTGCT TCGGAAAGGA TATGATTTAG TGTCTGGAGG
1191 CACTGATAAT CATTTAGTTT TGGTGAATCT GAAAAACAAG GGAATAGATG GATCAAGAGT GGAAAAAGTA
1261 TTAGAATTAG TACATATTGC AGCAAACAAG AATACTGTTC CTGGTGATGT TTCTGCCATG GTTCCCGGTG
1331 GCATCCGTAT GGGAACACCA GCCCTCACAT CAAGAGGATT CATTGAGGAA GATTTTGCAA AAGTGCGCGA
1401 GTATTTTGAT TTAGCCGTCA AGATAGCCTT AAAGATCAAA GCAGAGTCTC AAGGAACAAA GTTGAAAGAC
1471 TTTGTAGCAA CAATGCAATC AAATGAGAAA TTACAGTCAG AGATGTCAAA GCTCCGTGAG ATGGTAGAAG
      < R998
      TGCTACTCT ATGTTTCTCA TC
      < R257
      CT ATGTTCTAG GC
1541 AATATGCTAA GCAATTCCCA ACGATTGGGT TCGAGAAAGA GACGATGAGA TACAAAGAGT AG

```

AtSHM6 Promotor+5' UTR

```

      P39 >
      GCAGAGAAAC TAGTAACA
1  gcagagaaac tagtaacact ctctatataa attaatattt aatgcaagtt tgactgttta attcaaagta
71  tctaatatgt caattgattt acttccactt atgaatttaa atacatgttc aaagaaatga actctttgag
141  tcttgactaa caaaacaaat taaataacct gatatggttt atttattgaa ttatattatt atttttcaac
211  gcttaaacca caagtttggtg atatttttgg aaatataaga ttttttgttc tgttttgtaa ataaaatatt
281  caatattaca gtttaggaaa agtctcataa atatttataa aactttttat taacatagat tcgtttttag
351  ttttgcatat ttcatttggt tttgtgttaa aaaaaatata tataaaaaatt aggatcacat gcaaattgta
421  ttcactagag aaggagatgc gtgtgattca actagtttat ttatttgaca aatagttttc ttttgattat
491  acattttaa tagatgttta tttcgttatg ttcagatgaa ttttttttg aaattttcat gtaactattt
561  tcaattatta atttatttat ttattttcaa aaaaaatatt ttatttttgt gattggtttg gtttgcaagt
631  aatatatgat tgtaaaacta aaccaatcaa accgatgtaa gtcaccggct actccggttg aaaagtatgc
701  ggcttctaga atcagtctca aagccgtcat caactattca gccggttaacc cttccaaatt ccatattcgt
771  tatttccctc atttgttttt ctcttttccc cttctctctt atagcttccg acgagagaga
841  agaagcaaag caaaattcga tcgctctggg tttttgatct ttttagggtt ctggcaaat tggatggaaa
911  cctcaacttt atccaaagat aatcataaag gaagaagctt tcgttgttgt ttccattgtt gcagctcctt

```

```

981  caaaaactct tgtctctatt gctttcacag ctaagaattc tcgattccat cgttgctggtt ttcgattttg
      < P40
      AGAAGATC TAAAACCggT ACCTGGCATA T
1051  acgaaattgg gttcttctag attttggttA TGGACCGTAT AG

```

AtSHM6 ungespleißt

Exon, Großbuchstaben

Intron, Kleinbuchstaben

```

1   ATGGACCGTA TAGCTCAATC AGATCTCTCT TTAGGATTCTG GTAGCTCCCA CGCTTTACCT CTACCTCATC
71  CTCCTAGAAT CCCAATCGCT GATGACTCAA TCACGCTTCA GATTGATTCC AGCTTCCGTC CTTCGTCTAA
141 TCCTATGCCT CCTGTTCCCTC TTCAGTTACT TGAGCAGAGA TTCGATGTCA CCGGATCCTG TAGCCGAGTT
211 GTTGAGGAGG ACGATGAGGT TGTGGTGAT AATGATGATG ATGATCAAAG AGAAGAGGAG CAATTTATTC
281 TCTTGGGTCA TCCTATGAAG TTGAAACGAG GTAGAGGTGG GAATTCGTAT TCATTGGCAT CATCAAGTCC
351 TTGTAAGAGA TTTGTAGTTG ATTCAGGGAT TGAAAGTAGG CGAGCTGTTG TTAGAGCTTG GGGTAATCAG
421 TCGATTGAAG AAGCTGATCC TGAGATTCAT GAGTTTATGG AAAAGGAGAA GCAGAGACAA TTTAGAGGTA
491 TTGAGCTTAT AGCTTCTGAG AATTTCTGTG GTAGAGCTGT GATGGAAGCT TTAGGAAGTC ATTTGACTAA
561 TAAGTACTCT GAAGGAATGC CTGGAGCTAG ATACTATACG GGAATCAGT ATATTGATCA GATTGAGATT
631 CTTTGCCAAG AGCGTGCGCT TGCAGCTTTT GGAATAATC ATGAGAAATG GGGAGTTAAT GTGCAGCCTT
701 ATTCGTGCAC TTCTGCCAAT TTCGCTGTTT TCACTGGTCT TTTGATGCCC GGTGAACGAA TTATGGGATT
771 GGATTCTCCC TCAGGTGGTC ATATGAGTCA TGGGTATTAT ACACCAGGTG GGAAGAAAGT CTCTGGTGCG
841 TCTATATTCT TTGAGAGCTT TCCATATAAG GTTGACCCCTC GTACAGGGTA TATTGATTAC GATAAGCTTG
911 AGGAAAAGGC GCTTGACTAT CGTCCTAAGA TACTTATTTG TGGTGGGAGT TCATATCCGA GGGACTGGGA
981 ATTCCTTAGG TTTAGGCATA TTGCAGACAA ATGTGGAGCT GTTTGTATGT TTGACATGGC ACAGATTAGT
1051 GGTCTTGTCG CTGCCAAGgt atgttctttc tegttttcca tattgcgtta tggattgttt gtcattaaac
1121 ttgaagctta agcacatgat ctttttgttt actcagtgat atttattaag cctacttttc tttgcattct
      P143 >
      TGCGA TATTGTTACC
1191 cttgacgttt tggtttctgt caatgttgta gGAAAGTCCA AATCCATTCTG ATTATTGCGA TATTGTTACC
      TCAAC
1261 TCAACAACAC ACAAGTCTCT CCGTGGCCCT AGGGGCGGCA TCATATTTTA CAAGAGAGGC TTGAAGCCCA
1331 AGAAGCAAAG CATAAATCTT AATCACTGTG AGAGCAATAT CCAGTATGAT TTTGAAGAAA AAATCAACTT
1401 TTCTGTCTTT CCATCGTTGC AAGGGGGGCC TCACAATAAC CATATAGCTG CTCTAGCCAT TGCCCTCAAG
1471 CAGGCCGCTT CACCAGAGTA CAAGCTTTAC ATGCGACAGG TCAAAAAAAAA TGCTAAGGCT TTAGCATCTG
1541 CTTTGATAAG CAGAAAGTGC AAGCTGATAA CAGGTGGCAC CGATAATCAT TTGCTTCTCT GGGATCTGAC
1611 TCCTTTGGGC TTGACAGgta tgtgattagt tcctcttatt cttggcagat aaggaaatta ctcgcactat
1681 gtgattcatt gccttacgta agctattggc agcattgcaa ctgtgtctga ttttccatgg tgttagatct
1751 gcttaaccat gtgtcatggg tctatagcaa aattttacca gctatttgag acaatggctg agtttcttag
1821 cgtatctctt ttttctcatc tctctaggtt gtggatagcc tacattacta gcttgatggc caatgatcag
      <-----SALK 050632-----|
      < R175
1891 tctgaaatct attataaaac ttgtttgaga ttgtaactaa acttatatgt ctaatttacc aaaatcaaaag
1961 tctcactttt ttgacgtctg taccatgcat atggttttagc tgtgtgtcca aagacgactc aaatcttccg
2031 ccttgatgatt ttttcagGCA AGGTGTATGA GAAAGTTTGC GAGATGTGCC ATATCACGGT CAACAAAAGTG
2101 GCCATTTTCA GCGAAAACGG TGTTATTTCC CCTGGAGGAG TGAGAATAGG TAAGCAAATT AAATTCTCAA
2171 GGAAATCTCA ACACTTTGGA CTTAGAATGA AACTCAGTGT GCTTTGAGTT CTTTTTCTT GTTGTCTGAT
2241 TCTTGACAAT GGGCTCATGT ATCAGGCAGT CCGGCTATGA CCTCAAGAGG TTGTTTAGAA CCAGAATTTG
2311 AGACAATGGC TGATTTTCTA TATAGAGCTG CTCGATAGC TAGTGCTGCA CAAAGGGAAC ACGGGAAGTT
2381 GCAAAAGGAA CCGCTCAAAA GCATCTATCA CTGTAAGAGG ATTGCAGATC TTCGGAACCA AGTCGAAGCT
      < R264
      GGACGGAAA CgGTACcct
2451 TTTGCTACTC AGTTTGCAAT GCCTGCCTTT GACATGTGA

```

AtSHM6, ORF

```

                P142 >
                ACCGTA TAGCTCAATC AGAT
                R250 >
                ATGGACCGTA TAGCTC
                R929 >
                ATGGACCGTA TAGCTCAATC AGATCTC
1   ATGGACCGTA TAGCTCAATC AGATCTCTCT TTAGGATTTCG GTAGCTCCCA CGCTTTACCT CTACCTCATC
71  CTCCTAGAAT CCCAATCGCT GATGACTCAA TCACGCTTCA GATTGATTCC AGCTTCCGTC CTTCGTCTAA
141 TCCTATGCCT CCTGTTCCCTC TTCAGTTACT TGAGCAGAGA TTCGATGTCA CCGGATCCTG TAGCCGAGTT
211 GTTGAGGAGG ACGATGAGGT TGTTGGTGAT AATGATGATG ATGATCAAAG AGAAGAGGAG CAATTTATTC
281 TCTTGGGTCA TCCTATGAAG TTGAAACGAG GTAGAGGTGG GAATTCGTAT TCATTGGCAT CATCAAGTCC
351 TTGTAAGAGA TTTGTAGTTG ATTCAGGGAT TGAAAGTAGG CGAGCTGTTG TTAGAGCTTG GGGTAATCAG
421 TCGATTGAAG AAGCTGATCC TGAGATTCAT GAGTTTATGG AAAAGGAGAA GCAGAGACAA TTTAGAGGTA
491 TTGAGCTTAT AGCTTCTGAG AATTTCTGTG GTAGAGCTGT GATGGAAGCT TTAGGAAGTC ATTTGACTAA
561 TAAGTACTCT GAAGGAATGC CTGGAGCTAG ATACTATACG GGAATCAGT ATATTGATCA GATTGAGATT
631 CTTTGCCAAG AGCGTGCGCT TGCAGCTTTT GGAATAATC ATGAGAAATG GGGAGTTAAT GTGCAGCCTT
701 ATTCGTGCAC TTCTGCCAAT TTCGCTGTTT TCACTGGTCT TTTGATGCCC GGTGAACGAA TTATGGGATT
771 GGATTCTCCC TCAGGTGGTC ATATGAGTCA TGGGTATTAT ACACCAGGTG GGAAGAAAGT CTCTGGTGCG
841 TCTATATTCT TTGAGAGCTT TCCATATAAG GTTGACCCTC GTACAGGGA TATTGATTAC GATAAGCTTG

                R15 >
                CCTAAGA TACTTATTTG TGGTGGGAG
911 AGGAAAAGGC GCTTGACTAT CGTCCTAAGA TACTTATTTG TGGTGGGAGT TCATATCCGA GGGACTGGGA
981 ATTCCCTAGG TTTAGGCATA TTGCAGACAA ATGTGGAGCT GTTTTGATGT TTGACATGGC ACAGATTAGT
1051 GGTCTTGTCG CTGCCAAGGA AAGTCCAAAT CCATTCGATT ATTGCGATAT TGTTACCTCA ACAACACACA
1121 AGTCTCTCCG TGGCCCTAGG GGCGGCATCA TATTTTACAA GAGAGGCTTG AAGCCCAAGA AGCAAAGCAT
1191 AAATCTTAAT CACTGTGAGA GCAATATCCA GTATGATTTT GAAGAAAAAA TCAACTTTTC TGTCTTTCCA
1261 TCGTTGCAAG GGGGGCCTCA CAATAACCAT ATAGCTGCTC TAGCCATTGC CCTCAAGCAG GCCGCTTCAC
1331 CAGAGTACAA GCTTTACATG CGACAGGTCA AAAAAAATGC TAAGGCTTTA GCATCTGCTT TGATAAGCAG

                < R18
                TC GACTATTGTC CACCGTGGCT AT
1401 AAAGTGCAAG CTGATAACAG GTGGCACCAG TAATCATTTG CTTCTCTGGG ATCTGACTCC TTTGGGCTTG
1471 ACAGGCAAGG TGTATGAGAA AGTTTGCAG AGTGCCATA TCACGGTCAA CAAAGTGCC ATTTTCAGCG
1541 AAAACGGTGT TATTTCCCTT GGAGGAGTGA GAATAGGCAG TCCGGCTATG ACCTCAAGAG GTTGTTTAGA
1611 ACCAGAATTT GAGACAATGG CTGATTTTCT ATATAGAGCT GCTCAGATAG CTAGTGTCTG ACAAAGGGAA
1681 CACGGGAAGT TGCAAAAGGA ACCGCTCAAA AGCATCTATC ACTGTAAAGA GATTGCAGAT CTTCGGAACC

                < R930
                CGTT ACGGACGGAA ACTGTACACT
                < R252
                GACGGAA ACTGTGATCA

                < P144
                GATGA GTCAAACGTT ACGGA
1751 AAGTCGAAGC TTTTGCTACT CAGTTTGCAA TGCCTGCCTT TGACATGTGA

```

AtSHM7 Promotor+5' UTR

```

                P41 >
                AGTTTTTGAG ATCAGGTT
1   agtttttgag atcaggtttt ggttttgtct ttaaacaat cgagtgatga tgttaaaaaa atgatatatc
71  atgtatgggc ttataatagc ccactgggct tttggatggt tctagctctc acgtctacat ttctacatca
141 ccgctgtaaa cagttaaata tgttttttac gagtgtgaga gaactcattc tcaacaat ttgtttttc
211 ttgatttgtt ttatatatta aaatattgat atatttccct cgtttttatt cgtcatttta gtttattcat
281 cgtttttgaa ctcaaaat ttgtttataat aatcatcggt ttagagtttt aattcagatg ttttgaaac
351 attttagttt tgtccctatt gttttagtgc tttgactaat aaaaaaatta taaatatatg aataaagggc
421 aaaaacgaaa atttaattat tttttgaatt tatgtgcaaa attattttat tttaaaacg agggagtatt
491 acataaattt tatcaaatat ttatgtttat tcatgaatat ttctataaat ctttttcaaa gattgttaaa
561 acaatattat gattaaaaat gtacagaaag aaatataatt taaaacacga tctttgtaaa cattttttta
631 tgaacttata aatattttta gtgaaaaata catacaaaag agttataata aagagctgag actgtacaaa
701 acaatttttc agaaaatgat aaaattttat ttcaaaaaata ttttgtaaaa tcggttaattg taataaaaaa
771 atcaacctta agagaatata tgttaactaa gtttttaaat acttataaac cattaatatg tataagttag
841 ataattgttt gttttaccaa ttaaacaata aataagattg gaaatacatg agtagtaaaa agcgcacata
911 atgaaaacta catgaagaat atttataatt aaaatctttc gaatttataa aggggcattt tctatatgaa
981 aaatacttta ttttagttgta catttttcgaa acttcccttc attaaaagcg ttaaattggt tttgggactt

```

```

1051  tgagagcggt aaattgtcaa aagattatac agtccaaaag atcatacatg ttttggtttg atttttaaaa
1121  ttgaaggga aaatgtgtca aattcatatt atcccagttg ttgttatgct tatagagaaa catattcgta
1191  gtcactctga catcttcctt taaaaataag aaaattgacg ttactgttgt tggaaatcgt aagttttaat
1261  attaaatata aattaagtct tatggctatt aatttttctc ttttttgcc tgcctttcag ctgctaagta
1331  actagcggac caacacgcaa tgcaaaagta ttcaggtagt cgtctataca ttctggcggt cattgttatt
1401  ttgtttatat acaaattttg ttaagatttt tcagaaatac gtacataaaa cgaaacaaat taaccaaatg
1471  catatatcaa accaaaagaa tagacatata ttacgtagca aacatttgcg aaaactatcg ccgatatatt
1541  tgcaagaatc aaaataacaa attttagttt gtaactgtaa taaatttatt aaaatcaata ttttttaggc
1611  aaataactagt cggggtttca atattcaaag acaaactctac tctaatacat acaatatacc atagtccaac
1681  tccatcccat ttcgtccact tctcactttt catgcggttt agcattacca aaatcttgat gctattggta
1751  tgggtctatt ttattggtaa aacttttttt ttctattttt ttttgttatc atccattcat accctaatta
1821  cttaaagtaa gacaaaacta ttttaaggaga tcaaaagctg atcttgcata gttgcataat aagatattta
1891  tttgaactta tctttgcaact ttgaaatcta aaatttttct aacaaaaaac gttttatatc ggtcaaaatg
1961  aatctaacta actttttggg ctagattagc tttagaaacc cacttttttc atcaaattga cacgatccta
2031  ctactaccgg ctattaccag tcgacaaggt ccaccgcata agctaataca acctgaaaag cgtccagata
2101  cataactctc tattaccggt acccggtaat ctcttttctc atttatttgt tccttctctt < P42
                                     AGTAGAAG TTGCAGgTAC
2171  ccacagaacc aaaaaagcga attaggtcaa aaaaacaaat cccaaatctt catcatcttc aacgtttATG
                                     P42
                                     CTAAACTCA
2241  GATTGTGAGT

```

AtSHM7 ungespleißt

Exon, Großbuchstaben
Intron, Kleinbuchstaben

```

                                     R251 >
                                     ATGGATTGGA GTCGTTCTC
1  ATGGATTGGA GTCGTTCTCA AACAAATTTT CAATTAGGGT TTGGTTGTTC ACACGCATCA ATGACTCCAA
                                     |-----SALK 118251-->
                                     R175 >
71  CACCAACACC AAGAGCTCCA ATCGCAGACG ATTTCGATTAA TCTACAAGTC GATCAAAGTT TCCGATCATT
141  ACCAACAACCT TTCTCTCCGA TTCCGTTACA ATTACTCGAA CAAAAAGCCG AGAAGACCAC CACCGTTGAT
211  GAGCCAAAGA AAGATGGAGG AGGAGGAGGA GATCAAAGG AAGACGAGCA TTTCAGAATC TTAGGTCACC
281  ATATGTGTCT CAAAAGGCAA AGAGATTGTC CACTTTTGTT AACGCAATCA AAGCATCCGA AGAGAAGTTC
351  CATCGGTGAT TCAGATCTGG AATCGCGACG TGCTGCTGTA CGAGCTTGGG GTGATCAACC GATTCATTTG
421  GCGGATCCTG ATATTTCATGA GCTTATGGAG AAAGAGAAGC AACGACAAGT AAGAGGAATT GAATTGATTG
491  CTTCTGAGAA TTTCGTGTGT AGAGCTGTAA TGGAAGCTTT AGGTAGTCAT TTAACGAATA AATACTCTGA
561  AGGTATGCCT GGAGCTAGAT ACTATACTGG GAATCAATAT ATTGATCAGA TTGAGAACTT CTGTATTGAG
631  CGTGCTCTTA CTGCGTTTGG TCTTGAATCT GATAAATGGG GTGTTAATGT TCAGCCTTAT TCTTGTAATT
701  CTGCTAACTT CGCGGTGTAT ACCGGACTTT TATTGCCCGG TGAACGGATT ATGGGGCTTG ATTCGCCTTC
771  TGGTGGTCAT ATGAGTCATG GTTATTGTAC TCCTGGTGGG AAGAAGATT CGGCTGCTTC CATCTCTTT

841  GAGAGTTTTT CTTATAAAGT GAATCCTCAA ACTGGGTATA TTGATTATGA TAAGCTTGAA GATAAGGCGC
911  TTGATTACCG TCCTAAGATT CTTATTTGTG GTGGGAGTTC TTATCCTAGG GATTGGGATT TTGCAAGGGT
981  TAGACAGATT GCAGATAAGT GTGGAGCTGT TTTGATGTGT GATATGGCTC ATATTAGCGG TCTTGTGCA
1051 ACTAAGgttc gaatcttcta ctactatact tttattgata tgttgattag ttctgagatt tttaatgggt
1121 taggttgcac gtctagttag tgaatgtcag aggtagcagt attagatagt ttcaatttgg ttaggccatg
1191 tattgatata atgtgtttgt gttatgattt ttctatgttc tattgaaacc ttagattgtt tgattacttt
1261 ctatgcaaag tctttttctg tggtagacttt gaaataatat gatgaatgag tttttggtgt gtcagtcaat
1331 attgtttgaa actattcgta tatgtagact tttgttatga ttctgttcca ggaaatattg tttctgaatt
1401 tggtttggtg tttttgttat ctacagGAAT GTTCAAATCC ATTTGATCAC TGTGACATAG TAACCTCCAC
1471 TACTCACAAA GGTCTACGTG GTCCTAGAGG AGGTATCATC TTCTACAGGA GAGGCCCAAA GATAAGAAAG
1541 CAGGGCCATC ACTCTAGCCA TTGTGACACT TCCACGCATT ACGATCTAGA GGAAAAGATC AACTTTGCTG
1611 TTTTTCATC TCTACAAGGA GGTCCACACA ACAACCATAT CGCTGCTCTT GCCATTGCAT TGAAACAAGT
1681 GGCCACTCCA GAGTACAAAG CTTACATACA ACAGATGAAG AAAACGCCCC AAGCTTTAGC AGCAGTCTT
                                     < R19
                                     CTGA CCAATGACCA CCATGTCTGT
1751 CTTAGAAGAA AATGCAGACT GGTACTGTT GGTACAGACA ACCATTTGTT GCTGTGGGAT CTCACTCCTA
1821 TGGGCTTAAC AGgtactgaa atcactcaac ctaaacataa ctactcgtcg atcgaaattt aaaattttgt
1891 ctgattttgt ttgtatctgt tttccaggGA AAGTCTACGA GAAAGTGTGT GAGATGTGCC ATATCACTTT
1961 AAACAAGACG GGTATATTCT GGGACAATGG TACAATATCT CCTGGAGGTG TAAGAATAGg taagcacaga
2031 tagattgggt tgcatattgt ttttgagtta gcgacatgtc acattcgtat tcacatcgat ccttttatca

```

```

2101 atagGGACAC CCGCAATGAC AACCCGAGGC TGTATAGAGT CTGATTTCTGA GACAATGGCG GATTTTCTGA
2171 TAAAGGCGGC TCAGATAACA AGTGCGTTGC AGAGAGAGCA TGGAAAGTCA CACAAGGAGT TTGTGAAAAG
2241 TTTATGCACC AACAAAGACA TAGCTGAGCT TAGAAACCGA GTCGAAGCAT TTGCTTTGCA GTATGAGATG
2311 CCTGCTTCTC TTATTCGAAT TGAATGA

```

AtSHM7, ORF

```

                R251 >
ATGGATTGA GTCGTTCTC
                R918 >
ATGGATTGA GTCGTTCTCA AAC
                P145 >
                GTTC ACACGCATCA ATGACT
1  ATGGATTGA GTCGTTCTCA AACAAATTTT CAATTAGGGT TTGGTTGTTC ACACGCATCA ATGACTCCAA
71  CACCAACACC AAGAGCTCCA ATCGCAGACG ATTTCATTAA TCTACAAGTC GATCAAAGTT TCCGATCATT
141  ACCAACAAC TTTCTCTCCG TTCCGTTACA ATTACTCGAA CAAAAAGCCG AGAAGACCAC CACCGTTGAT
211  GAGCCAAAAG AAGATGGAGG AGGAGGAGGA GATCAAAAAG AAGACGAGCA TTTCAGAATC TTAGGTCACC
281  ATATGTGTCT CAAAAGGCAA AGAGATTGTC CACTTTTGTT AACGCAATCA AAGCATCCGA AGAGAAGTTC
351  CATCGGTGAT TCAGATCTGG AATCGCGACG TGCTGCTGTA CGAGCTTGGG GTGATCAACC GATTCATTTG
421  GCGGATCCTG ATATTCATGA GCTTATGGAG AAAGAGAAGC AACGACAAGT AAGAGGAATT GAATTGATTG
491  CTTCTGAGAA TTTCTGTGTG AGAGCTGTAA TGGAAGCTTT AGGTAGTCAT TTAACGAATA AATACTCTGA
561  AGGTATGCC TGGAGCTAGAT ACTATACTGG GAATCAATAT ATTGATCAGA TTGAGAATCT CTGTATTGAG
631  CGTGCTCTTA CTGCGTTTGG TCTTGAATCT GATAAATGGG GTGTTAATGT TCAGCCTTAT TCTTTACTTT
701  CTGCTAACTT CGCGGTGTAT ACCGGACTTT TATTGCCCGG TGAACGGATT ATGGGGCTTG ATTCGCCCTC
771  TGGTGGTCAT ATGAGTCATG GTTATTGTAC TCCTGGTGGG AAGAAGATTT CGGCTGCTTC CATCTTCTTT
841  GAGAGTTTTT CTTATAAAGT GAATCCTCAA ACTGGGTATA TTGATTATGA TAAGCTTGAA GATAAGGCGC
                R15 >
                CCTAAGATA CTTATTTGTG GTGGGAG
911  TTGATTACCG TCCTAAGATT CTTATTTGTG GTGGGAGTTC TTATCCTAGG GATTGGGATT TTGCAAGGGT
981  TAGACAGATT GCAGATAAGT GTGGAGCTGT TTTGATGTGT GATATGGCTC ATATTAGCGG TCTTGTTGCA
1051  ACTAAGGAAT GTTCAAATCC ATTTGATCAC TGTGACATAG TAACCTCCAC TACTCACAAA GGTCTACGTG
1121  GTCCTAGAGG AGGTATCATC TTCTACAGGA GAGGCCCAAA GATAAGAAAG CAGGGCCATC ACTCTAGCCA
1191  TTGTGACACT TCCACGCATT ACGATCTAGA GGAAAAGATC AACTTTGCTG TTTTTCATC TCTACAAGGA
1261  GGTCCACACA ACAACCATAT CGCTGCTCTT GCCATTGCAT TGAAACAAGT GGCCACTCCA GAGTACAAAG
                CTGA
1331  CTTACATACA ACAGATGAAG AAAAACGCCC AAGCTTTAGC AGCAGCTCTT CTTAGAAGAA AATGCAGACT
                <R19
CCAATGACCA CCATGTCTGT
1401  GGTACTGGT GGTACAGACA ACCATTTGTT GCTGTGGGAT CTCACTCCTA TGGGCTTAAC AGGGAAAGTC
1471  TACGAGAAAG TGTGTGAGAT GTGCCATATC ACTTTAAACA AGACGGCTAT ATTCCGGGAC AATGGTACAA
1541  TATCTCCTGG AGGTGTAAGA ATAGGGACAC CCGCAATGAC AACCCGAGGC TGTATAGAGT CTGATTTCTGA
1611  GACAATGGCG GATTTTCTGA TAAAGGCGGC TCAGATAACA AGTGCGTTGC AGAGAGAGCA TGGAAAGTCA
1681  CACAAGGAGT TTGTGAAAAG TTTATGCACC AACAAAGACA TAGCTGAGCT TAGAAACCGA GTCGAAGCAT
                < R919
                GGACGAAGAG AATAAGCTTA ACTTACT
                < R253
                GCTTA ACTTTGA
                < P148
                ACTCTAC GGACGAAGAG AAT
1751  TTGCTTTGCA GTATGAGATG CCTGCTTCTC TTATTCGAAT TGAATGA

```

GUS, ORF aus pCambia1381

```

                < R994
                CC GGACACCCGT AAGTCAGACC
1  ATGTTACGTC CTGTAGAAAC CCCAACCCGT GAAATCAAAA AACTCGACGG CCTGTGGGCA TTCAGTCTGG
71  ATCGCGAAAA CTGTGGAATT GATCAGCGTT GGTGGGAAAG CGCGTTACAA GAAAGCCGGG CAATTGCTGT
141  GCCAGGCAGT TTTAACGATC AGTTCGCCGA TGCAGATATT CGTAATTATG CGGGCAACGT CTGGTATCAG
211  CGCGAAGTCT TTATAACGAA AGGTTGGGCA GGCCAGCGTA TCGTGCTGCG TTTTCATGCG GTCACTCATT
281  ACGGCAAAGT GTGGGTCAAT AATCAGGAAG TGATGGAGCA TCAGGGCGGC TATACGCCAT TTGAAGCCGA
351  TGTCACGCCG TATGTTATTG CCGGGAAAAG TGTACGTATC ACCGTTTGTG TGAACAACGA ACTGAACTGG
421  CAGACTATCC CGCCGGGAAT GGTGATTACC GACGAAAACG GCAAGAAAAA GCAGTCTTAC TTCCATGATT
491  TCTTTAACTA TGCCGGGATC CATCGCAGCG TAATGCTCTA CACCACGCCG AACACCTGGG TGGACGATAT
561  CACCGTGGTG ACGCATGTCT CGCAAGACTG TAACCACGCG TCTGTTGACT GGCAGGTGGT GGCCAATGGT

```

```

631 GATGTCAGCG TTGAAC TGCG TGATGCGGAT CAACAGGTGG TTGCAACTGG ACAAGGCACT AGCGGGACTT
701 TGCAAGTGGT GAATCCGCAC CTCTGGCAAC CGGGTGAAGG TTATCTCTAT GAACTGTGCG TCACAGCCAA
771 AAGCCAGACA GAGTGTGATA TCTACCCGCT TCGCGTCGGC ATCCGGTCAG TGGCAGTGAA GGGCCAACAG
841 TTCCTGATTA ACCACAAACC GTTCTACTTT ACTGGCTTTG GTCGTCATGA AGATGCGGAC TTACGTGGCA
911 AAGGATTCTGA TAACGTGCTG ATGGTGCACG ACCACGCATT AATGGACTGG ATTGGGGCCA ACTCCTACCG
981 TACCTCGCAT TACCCTTACG CTGAAGAGAT GCTCGACTGG GCAGATGAAC ATGGCATCGT GGTGATTGAT
1051 GAAACTGCTG CTGTCGGCTT TAACCTCTCT TTAGGCATTG GTTTCGAAGC GGGCAACAAG CCGAAAGAAC
1121 TGTACAGCGA AGAGGCAGTC AACGGGGAAA CTCAGCAAGC GCACTTACAG GCGATTAAAG AGCTGATAGC
1191 GCGTGACAAA AACCACCCAA GCGTGGTGAT GTGGAGTATT GCCAACGAAC CGGATACCCG TCCGCAAGTG
1261 CACGGGAATA TTTGCCCACT GCGGAAGCA ACGCGTAAAC TCGACCCGAC GCGTCCGATC ACCTGCGTCA
1331 ATGTAATGTT CTGCGACGCT CACACCGATA CCATCAGCGA TCTCTTTGAT GTGCTGTGCC TGAACCGTTA
1401 TTACGGATGG TATGTCCAAA GCGGCGATTT GGAAACGGCA GAGAAGGTAC TGGAAAAAGA ACTTCTGGCC
1471 TGGCAGGAGA AACTGCATCA GCCGATTATC ATCACCGAAT ACGGCGTGGA TACGTTAGCC GGGCTGCACT
1541 CAATGTACAC CGACATGTGG AGTGAAGAGT ATCAGTGTGC ATGGCTGGAT ATGTATCACC GCGTCTTTGA
1611 TCGCGTCAGC GCCGTCGTCG GTGAACAGGT ATGGAATTTT GCCGATTTTG CGACCTCGCA AGGCATATTG
1681 CGCGTTGGCG GTAACAAGAA AGGGATCTTC ACTCGCGACC GCAAACCGAA GTCGGCGGCT TTTCTGCTGC
1751 AAAACGCTG GACTGGCATG AACTTCGGTG AAAAACCGCA GCAGGGAGGC AAACAATGA

```

eGFP, ORF aus pCambia1302

```

                R717 >
ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTC
1  atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac ggcgacgtaa
71  acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt
141 catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc ctcgtagacca ccctgaccta cggcgtgcag
211 tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg
281 tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg
351 cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac
421 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac ggcataaagg
491 tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac
561 ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac tacctgagca ccagtcgcg cctgagcaaa
                < R943
                GAGCCGT
631  gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga
                R943
ACCTGCTCGA CATGTTCACT
701  tggacgagct gtacaagtga

```


Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Bauwe für die Bereitstellung des Themas und für die unterstützenden und aufbauenden Ratschläge danken.

Weiterhin danke ich Professor Dr. Hagemann für den einen oder anderen wertvollen Tipp.

Bedanken möchte ich mich auch bei M. Harder, U. Bauwe, C. Michl und der gesamten technischen Assistenz für die Unterstützung bei diversen kleineren und größeren Arbeiten.

Für die Anfertigung der GFP-Aufnahmen geht mein Dank an das Zentrum für Lichtmikroskopie der Uni Rostock unter Leitung von Herrn PD Dr. Kuznetsov.

Ein Dank geht nach Golm an das MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie für die Unterstützung bei der Metabolomanalyse; PD Dr. Alisdair Fernie, Dr. Adriano Nunes Nesi

Der gesamten Abteilung Pflanzenphysiologie danke ich für die Zusammenarbeit.

Schließlich danke ich meinen Eltern und meiner gesamten Familie für die moralische Unterstützung während der vergangenen Jahre.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich anderweitig nicht versucht habe, mit oder ohne Erfolg, eine Dissertation einzureichen.

Steffen Müller

Rostock, 6.5.2010